

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Polirorfismos enzimáticos en cancer de pulmón

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Carlos Jara Sánchez

Madrid, 2015

R. 18.361

Te 616.24-006.6

√AR

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

BIBLIOTECA UCM



5301456121

**POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN
CANCER DE PULMON**



Biblioteca
de Medicina

Carlos Jara Sánchez

Madrid, 1991

Colección Tesis Doctorales. N.º 178/91

X-53-008962-8

© Carlos Jara Sánchez

Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1991.
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-21475-1991

TESIS DOCTORAL:
POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN
CANCER DE PULMON

Por el Licenciado en Medicina y Cirugía
Dr. Carlos Jara Sánchez

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID. 1990

Con mi agradecimiento más sincero
a Ana Barandica Romo.
Sin su ayuda, esta tesis habría
sido bien distinta

AGRADECIMIENTOS

A todos los pacientes de los Hospitales Gregorio Marañón de Madrid, Clínico San Carlos de Madrid y Clínico Universitario de Zaragoza, que participaron voluntariamente en la realización de este estudio.

Al Profesor Dr. D. Jose María Ladero Quesada, director de esta Tesis, maestro y amigo. Sus consejos y recomendaciones, su participación activa, su enseñanza de las diversas materias, su estímulo y en especial su ejemplo, han hecho posible esta empresa.

Al Profesor Dr. D. Julio Benítez por sus aportaciones en la técnica de determinación del fenotipo oxidativo.

A la Dra M.J. Fernández Gundín por su participación en las determinaciones del fenotipo acetilador y a los Dres. J. Cobaleda, A. Llerena y C. Martínez por su participación en la determinación del fenotipo oxidativo.

Al *Prof. Dr. D. Gumerindo Pérez Manga*, Jefe del Servicio de Oncología del Hospital Gregorio Marañón de Madrid por su apoyo y su colaboración, así como al Dr. D. Ramón García Gómez, y a los restantes miembros de dicho Servicio, del que formé parte como Médico Residente, todos ellos compañeros y amigos.

Al *Prof. Dr. D. Alejandro Tres Sánchez*, Jefe del Servicio de Oncología del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza. Su constante estímulo para la realización de esta Tesis y su colaboración, junto con la del resto del Personal de dicho Servicio permitieron culminar este trabajo.

Al *Prof. Dr. Javier Suárez*, Jefe del Servicio de Neumología del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza, por las facilidades otorgadas en la recogida de datos, recogida de muestras y aporte de pacientes.

Al *Dr. Félix Javier Jiménez Jiménez*, compañero y amigo desde hace tantos años.

A la *Dirección General de Investigación Científica y Técnica*, gracias a cuya ayuda PB 86-0672 se han sufragado los costes del presente estudio.

RESUMEN

RESUMEN

El cáncer del pulmón es la primera causa de mortalidad por tumores en países desarrollados. Esta neoplasia está vinculada patogénicamente de forma indiscutida al consumo de tabaco. Se ha comprobado a su vez la existencia de variaciones genéticamente determinadas en la población general en la capacidad metabolizadora, y en particular en la capacidad oxidativa y acetiladora de fármacos, carcinógenos u otras sustancias. Así, pueden encontrarse individuos con fenotipo oxidativo lento o fenotipo oxidativo rápido. Igualmente se distinguen sujetos con fenotipo acetilador lento o rápido. Se sabe que algunos carcinógenos presentes en el humo del tabaco pueden sufrir metabolización a través de oxidación o acetilación.

En el presente estudio se han sometido a valoración el *polimorfismo enzimático oxidativo de debrisoquina* y el *polimorfismo enzimático acetilador de sulfametacina* en pacientes con cáncer de pulmón y en controles. El polimorfismo de debrisoquina se ha determinado utilizando la técnica de Lennard, mientras que el polimorfismo de sulfametacina se ha determinado utilizando la técnica de Bratton y Marshall.

Nuestros resultados indican que para el polimorfismo oxidativo de debrisoquina la distribución del fenotipo oxidativo en el grupo de pacientes con cáncer de pulmón no difiere significativamente en comparación con el grupo control. El análisis por separado del subgrupo de pacientes con los tipos histológicos de cáncer de pulmón con una relación epidemiológica y experimental más estrecha con el consumo de tabaco (subtipos carcinoma epidermoide y microcítico), pone en evidencia, sin embargo, una proporción de oxidadores lentos significativamente más baja que la existente en sujetos del grupo control.

En el estudio del polimorfismo acetilador de sulfametacina, no se han detectado diferencias en la distribución de pacientes con fenotipo acetilador rápido frente a la población control. En el análisis por subgrupos histológicos, hemos encontrado que en pacientes con carcinoma microcítico la tasa media de acetilación es inferior, tanto en acetiladores lentos como en acetiladores rápidos, a la tasa media de acetilación de la población control. Una posible explicación es una hipotética inhibición sobre la síntesis o la actividad enzimática ejercida por el propio tumor, que sería así un efecto paraneoplásico.

En conclusión, hemos encontrado una *asociación significativa entre la presencia de fenotipo oxidativo rápido y el padecimiento de los subtipos histológicos microcítico y epidermoide de cáncer de pulmón*. No es posible establecer inequívocamente si esta relación es o no de naturaleza etiológica. Es posible que el polimorfismo enzimático de debrisoquina sea un factor de riesgo para el desarrollo de una neoplasia pulmonar en sujetos fumadores. Este factor de riesgo, genéticamente mediado, interaccionaría con factores exógenos como el consumo de tabaco.

El polimorfismo acetilador de sulfametacina no guarda relación con el padecimiento de cáncer de pulmón.

INDICE

PARTE I

Sección 1: Justificación y planteamiento.....	1
Sección 2: Tabaco y cáncer de pulmón Mutagenicidad del tabaco.....	5
Sección 3: Variaciones en metabolismo de xenobióticos.....	25
Sección 4: Sistema Citocromo P-450 hepático.....	30
Sección 5: Polimorfismo oxidativo de debrisoquina.....	41
Sección 6: Consecuencias farmacológico-clínicas del fenotipo oxidativo de debrisoquina.....	50
Sección 7: Relación fenotipo oxidativo de debrisoquina y patología clínica.....	57
Sección 8: Valoración de fenotipo oxidativo de debrisoquina.....	71
Sección 9: Polimorfismo acetilador de sulfametazina.....	77
Sección 10: Acetilación y variaciones en respuesta y toxicidad a fármacos.....	88
Sección 11: Fenotipo acetilador y neoplasia.....	96
Sección 12: Fenotipo acetilador y otros procesos.....	102

PARTE II

Objetivos.....	108
Pacientes y Métodos.....	112
Resultados.....	133
Discusión.....	138
Conclusiones.....	161
Bibliografía.....	155

PARTE I

SECCION 1:

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO

El cáncer de pulmón constituye la neoplasia responsable del mayor número de muertes en los países desarrollados. Está establecida de forma inequívoca una vinculación epidemiológica y experimental con el consumo de tabaco.

El humo del tabaco contiene múltiples sustancias con poder carcinógeno, entre las que destacan: 3,4 benzopireno, dibenzoantraceno y distintas nitrosaminas.

Por otro lado, la oxidación es la vía de biotransformación más frecuentemente utilizada en la metabolización de fármacos y agentes químicos diversos. La mayoría de las reacciones de oxidación tienen lugar por isoenzimas del citocromo P-450. Diversos carcinógenos presentes en el humo de tabaco pueden seguir en su detoxificación fisiológica una vía oxidativa.

Se ha demostrado la existencia de variaciones genéticas en el metabolismo oxidativo, de forma que una

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

población determinada presenta subgrupos distintos en función de la capacidad oxidativa. Existen, así, individuos metabolizadores lentos o metabolizadores rápidos de determinados sustratos.

De esta forma, en la aún oscura génesis del cáncer de pulmón, se puede postular una interacción de factores exógenos (tabaquismo) con factores endógenos (variaciones en capacidad oxidativa), genéticamente mediados, que marcarían una susceptibilidad al padecimiento del proceso.

Esto permitiría explicar, al menos parcialmente, por qué solo un pequeño porcentaje de los fumadores desarrollan una neoplasia pulmonar, y paralelamente, por qué existe una tendencia real, aunque no bien delimitada, a la aparición de tumores en determinadas familias.

Igualmente se ha determinado el fenotipo acetilador en pacientes con cáncer de pulmón, intentando averiguar si la posesión de un fenotipo concreto constituye un

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

posible marcador de susceptibilidad genética al padecimiento de cáncer de pulmón.

En las secciones siguientes se realiza una revisión de los conocimientos actuales en lo referente a cada uno de los aspectos comentados: tabaquismo, mutagénesis por tabaco, citocromo P-450, polimorfismo oxidativo de debrisoquina y polimorfismo acetilador de sulfametazina.

SECCION 2:

TABACO Y CANCER DE PULMON

TABACO Y CANCER DE PULMON

El tabaquismo es considerado en la actualidad sin lugar a dudas un hábito directamente relacionado con el padecimiento de diferentes neoplasias, como pulmón, faringe, esófago, laringe, páncreas, riñón y vejiga (LaVecchia, 1987).

Datos epidemiológicos

En la mayoría de los países industrializados el cáncer de pulmón constituye la causa más importante de muerte por cáncer. Desde los estudios de Doll (1950), hace 40 años, se ha demostrado una asociación entre el consumo de tabaco, especialmente inhalación del humo del tabaco en cigarrillos, y este tipo de neoplasia. Los varones que fuman tienen un riesgo de cáncer de pulmón 14 veces mayor en comparación con no fumadores, con un paralelismo dosis-riesgo evidente.

En varones su incidencia varía entre 5-80 casos por 100.000 habitantes según los países. En mujeres el

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

hábito del tabaquismo constituye un hábito de incidencia creciente y desgraciadamente esto se ha traducido en un alarmante incremento de la incidencia del cáncer de pulmón (5-40 por 100.000 habitantes. Aunque se ha comentado que las mujeres fumadoras tienen un riesgo aumentado en menor medida (solo 2'5 veces) frente a las no fumadoras (Estapé, 1987), parece que diferencias en la cantidad de tabaco consumido y el tiempo de duración del hábito pueden explicar las diferencias de riesgo. Probablemente a igualdad de exposición, el riesgo sea similar entre hombres y mujeres (Schoenberg, 1989).

En el complejo proceso de la carcinogénesis pulmonar intervienen diversas variables. Destaca en primer lugar la cantidad de sustancias cancerígenas (carcinógenos). Sin embargo, es quizá más importante el tiempo de exposición a un determinado carcinógeno (Monographs, 1986; Peto, 1981). Otra variable interesante es la edad de comienzo del hábito (Doll, 1981).

Estudios ecogenéticos

Pese a todo, muchos grandes fumadores no desarrollan un cáncer de pulmón. Por otro lado, se observan casos de esta neoplasia en sujetos sin antecedentes de tabaquismo. Parece, pues, que existe una variabilidad individual en la susceptibilidad al padecimiento de cáncer de pulmón. Cabe suponer que el tabaco es un factor importante, pero sólo un factor más, implicado en la génesis de este tumor. La conjunción con otros factores abocaría al desarrollo de cáncer de pulmón. Se acepta la existencia de una constelación de factores causales en la carcinogénesis, de peso variable.

Se han realizado esfuerzos en la detección de factores genéticos que alterarían la respuesta del huésped a los carcinógenos, entrando así en el terreno de la susceptibilidad genética. Es también probable que factores ambientales mal conocidos puedan interaccionar con carcinógenos. En conjunto constituyen el área de trabajo de la epidemiología genética. Brewer (1971) acuñó el término ecogenética para designar este área de la investigación clínico-epidemiológica.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Es posible que exista una susceptibilidad hereditaria a la aparición de diversos procesos patológicos en la mucosa respiratoria, entre los que se incluiría solo en último término el cáncer de pulmón, más que una susceptibilidad inmediata al padecimiento maligno (Levine, 1989). De hecho, parece que existe un componente hereditario en la enfermedad obstructiva crónica de la vía aérea (EPOC) (Cohen, 1977). Notablemente, ciertos investigadores han demostrado que dentro del amplio grupo de sujetos fumadores, los pacientes con enfermedad obstructiva crónica de la vía aérea presentan un riesgo mayor de aparición de cáncer de pulmón que otros fumadores (Samet, 1986). Una posible explicación sea la presencia de un aclaramiento deficiente de carcinógenos o una susceptibilidad aumentada del tejido pulmonar a los efectos de los mismos (Cohen, 1978).

Son escasas las evidencias a favor del papel ecogenético en el cáncer. Se conocen 2 estudios que valoran la interrelación entre la historia familiar y el cáncer de pulmón, examinando adicionalmente el papel del tabaquismo (Tokuhata, 1963; Ooi, 1986). Estos estudios presentan características metodológicas

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

dispar, propias de los estudios genéticos y epidemiológicos respectivamente. En los estudios genéticos se explora el riesgo de enfermedad entre los parientes de un caso conocido. A la inversa, los estudios epidemiológicos valoran la historia familiar como un factor de riesgo para el padecimiento de una enfermedad dada.

Un acercamiento adecuado a este problema tropieza con diversos escollos metodológicos, que incluyen la valoración de la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón mejor que la tasa de incidencia. Otro problema es el llamado sesgo de recuerdo: los pacientes con cáncer de pulmón tienen más tendencia recordar un caso anterior de cáncer de pulmón en sus respectivas familias que la población general.

Se ha publicado que una historia de cáncer de pulmón en un pariente de primer grado aumenta la probabilidad de padecimiento de cáncer de pulmón. Horwitz (1988) hace énfasis este hallazgo en mujeres. Una mujer con historia familiar positiva y tabaquismo tienen una probabilidad 30 veces superior de desarrollar cáncer de pulmón que una mujer sin ninguno de estos antecedentes. Si la paciente era una gran fumadora el riesgo aumentaba en 50 veces. En cualquier caso, parece que el

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

riesgo del consumo de tabaco es mayor que el riesgo familiar.

Por último, existe un problema añadido: el riesgo familiar al padecimiento de una neoplasia no viene transmitido simplemente por la herencia genética. Múltiples hábitos (cuyo mejor ejemplo es el tabaquismo activo y pasivo) y estilos de vida (especialmente la dieta) son compartidos y transmitidos en el medio familiar y alguno de ellos puede estar implicado en la carcinogénesis. Descartar esta hipótesis alternativa es problemático.

MUTAGENICIDAD DEL TABACO

Se calcula que más de 50.000 sustancias químicas diferentes de origen natural o sintético y en muchos casos de uso comercial e industrial, tienen capacidad mutágena y eventualmente pueden ser carcinógenos. Pero también se ha comprobado que sustancias mutagenas abundan en la naturaleza y en los alimentos consumidos habitualmente. Del mismo modo, se producen múltiples carcinógenos durante los procesos metabólicos (Ames, 1984; Sugimura, 1985).

VALORACION DE MUTAGENESIS

Ames ha sido pionero en la valoración de mutagénesis. En concreto se ha valorado la mutagénesis en bacterias, dentro de las distintas manifestaciones bacterianas de lesión de ADN, como primer paso de la valoración de carcinogénesis (Simmon, 1981). Su prueba Salmonella-

higado de rata constituye el test básico más utilizado. Con dicho test se han llegado a identificar más de 5.000 sustancias químicas con capacidad mutágena (Environmental Mutagen Information Center Index, 1982).

Determinados compuestos ambientales u otros compuestos biológicos de estructura desconocida, han sido sometidos al test de Ames, estableciéndose su mutagenicidad. Ulteriormente ha sido conocida su composición química y sus capacidad carcinogénica. Destacan en este grupo los productos de la pirólisis de las proteínas en la preparación de los alimentos (Sugimura, 1982).

Una gran ventaja de los ensayos bacterianos es el bajo coste comparativo, en relación con animales de experimentación y su rápida realización (en horas o días).

Test de Ames

Se utiliza una cepa de *Salmonella typhimurium* portadora de una mutación (his⁻) que le impide producir uno de los enzimas requeridos para la síntesis del aminoácido histidina (que constituye un componente esencial de la composición proteica de las bacterias).

La consecuencia final es la incapacidad de crecimiento en un medio nutritivo mineral sin aporte exógeno de histidina (Maron, 1983).

Ocasionalmente se produce en esta cepa una mutación inversa, que resulta favorable al restaurar la secuencia normal del código ADN, con lo que se recupera la capacidad de síntesis de histidina (Shanabruch, 1980). La aparición de esta mutación es detectable fácilmente al aparecer colonias en medio sin histidina exógena. La tasa de aparición espontánea de mutación inversa es muy baja.

La administración al medio de sustancias causantes de mutaciones incrementará la tasa de mutaciones inversas (Barnes, 1982) y aumentará así la probabilidad de aparición de colonias sin requerimiento de histidina exógena.

En este sistema se implanta un elemento ulterior: la mezcla de extracto de hígado de rata a la cepa de bacterias del ensayo permite someter a la sustancia cuya mutagenicidad se analiza, a los procesos metabólicos de los mamíferos (Devoret, 1987). Precisamente el hígado es el órgano con una capacidad mayor de producción de metabolitos (y de elaboración de carcinógenos a partir de procarcinógenos). Asimismo, la

frecuencia mutagénica es mucho mayor en presencia de enzimas microsomales.

De entre las diversas cepas de *Salmonella typhimurium*, se utiliza en la valoración de mutagenicidad en orina la cepa TA 98 (Curvall, 1987).

Otros métodos de valoración de mutagenicidad

La cuantificación de las roturas cromosómicas o las alteraciones en el complejo proceso de intercambio de cromátides (sister chromatid exchange), es otra forma de valoración de daño celular por mutágenos (Hsu, 1987).

Recientemente se ha descrito una aproximación diferente a la valoración de mutagenicidad. La cuantificación del grado de formación de complejos ADN-carcinógeno (carcinogen-DNA adduct formation) constituye quizá el método más seguro de valoración de los efectos biológicos sobre un tejido (Nowak, 1988), al detectar de una forma directa el daño sobre el propio ADN.

Carcinogenesis por tabaco:

datos experimentales

El humo del tabaco es un amplio conjunto de sustancias químicas, de las que alrededor de 3.000 han sido identificadas. De ellas, se conocen al menos 38 carcinógenos en la fase de partículas (no gaseosa), mientras que en la fase volátil existen 16 (U.S. Department of Health and Human Services, 1982; Neil, 1984). Se piensa que estos carcinógenos no intervienen directamente, sino a través de su transformación química, por lo que en realidad son acreedores a la denominación de procarcinógenos. Tras las diversas modificaciones se convierten en sustancias de carácter electrofílico, de gran reactividad, en especial con las grandes macromoléculas celulares (Martínez Llamas, 1988).

En el humo del tabaco coexisten *sustancias inhibidoras enzimáticas*, como el monóxido de carbono, que bloquea el citocromo (Kaufman, 1983), e *inductores enzimáticos* como por ejemplo el 3-metilcolantreno. El efecto habitualmente observado en fumadores es la inducción

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

(Dawson, 1982), probablemente por actividad de los hidrocarburos policíclicos aromáticos. En estudios experimentales realizados se sugiere que el consumo de cigarrillos induce enzimas microsomales metabolizadoras de fármacos. Entre ellas se encuentra la Aril-Hidrocarburo-Hidroxilasa, dependiente del Citocromo P-450, que metaboliza una amplia variedad de compuestos endógenos y exógenos, y que al igual que otras isoenzimas de ese sistema oxidativo puede dar lugar a metabolitos no tóxicos y/o productos tóxicos (Friedman, 1985; Robinson, 1986).

En la tabla 1 se ven reflejados los carcinógenos que están actualmente admitidos como presentes en el humo del tabaco, según la American Conference of Governmental Industrial Hygienists Inc. y la International Agency for Research on Cancer (American Conference of Governmental Industrial Hygienist Inc, 1980; International Agency for Research on Cancer, 1982).

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

Los carcinógenos más potentes aislables en el humo del tabaco son los hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre los que destacan 3,4-benzopireno y dibenzoantraceno, en la fase particulada. En la fase gaseosa los carcinógenos más importantes probablemente sean distintas nitrosaminas.

Sustancias mutágenas del tabaco

El condensado de humo de tabaco es un potente inductor de mutaciones en diversas pruebas a corto plazo. También se ha demostrado que la orina de fumadores contiene sustancias mutagénicas (Yamasaki, 1977; Falck, 1980; Laire, 1982; Beek, 1982).

Entre los mutágenos presentes en el humo del tabaco se incluyen hidrocarburos policíclicos aromáticos, sus derivados nitroarenos (McCuy, 1982), productos de la pirólisis o aminoácidos aromáticos y polipéptidos. Dado que el metabolismo de los componentes del tabaco puede ocurrir a través de diferentes vías, es probable que

aun sean desconocidas múltiples sustancias de potencial capacidad mutágena (Florin, 1980; Izard, 1980).

Es fácilmente comprensible el problema que implica la valoración de mutagenicidad y el interés social y sanitario que conlleva.

Benzopireno

El benzopireno da lugar tras su metabolización a una serie de metabolitos intermedios. En primer lugar, una monooxigenasa dona un átomo de oxígeno dando lugar a los compuestos epóxidos (Jerina, 1978). A partir de los epóxidos se forman fenoles, quinones, o bien, tras una reducción, pasar a compuestos hidrocarbonados (Sugiura, 1980).

Los epóxidos pueden ser metabolizados a dihidrodíoles por la epóxido hidrolasa microsomal, siendo este un camino de detoxicación. También pueden ser conjugados con glutatión, reacción catalizada por la glutatión-S-transferasa citoplásmica, proceso que se considera beneficioso (Morgenstern, 1981). Los conjugados de

POLINORFINOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

glutación pueden a su vez ser metabolizados y convertidos en ácidos mercaptúricos, eliminándose así por orina (tioéteres). Por lo tanto, epóxidos, dihidrodioles, fenoles y quinonas se consideran metabolitos primarios de benzopireno, que a su vez puede sufrir subsiguientes pasos metabólicos.

En definitiva, el resultado es la producción de multitud de metabolitos primarios y secundarios, algunos de los cuales presentan gran capacidad para unirse a la molécula de ADN mediante enlace covalente. Epóxidos como el 4,5-epóxido, 7,8-epóxido y 9,10-epóxido tienen gran capacidad para unirse mediante fuertes enlaces al ADN sin más pasos intermedios. De todos los metabolitos formados el de mayor capacidad mutagénica, transformación celular y carcinogénesis es el 7,8-diol-9,10-epóxido (U.S. Interagency Group Staff on Carcinogens, 1986).

Nitrosaminas

Estas sustancias resultan de la nitrosación de diversos alcaloides durante la curación y procesamiento del tabaco.

En su metabolismo tiene lugar una alfa-carbón hidroxilación enzimática, que origina unos compuestos denominados diazohidróxidos. Estos dan lugar a su vez (a través de diferentes agentes metilantes) a metildiazohidróxidos, que tras hidrólisis dan lugar a 7-metilguanina, 0-metilguanina, 3-metil-adenina y otros productos (Pegg, 1983; Singer, 1983). Estas últimas sustancias tienen capacidad para reaccionar con el ADN y probablemente tengan importancia en la iniciación neoplásica (Singer, 1983). Las nitrosaminas provocan errores en la duplicación y en la replicación del ADN.

Arilaminas

En este grupo de compuestos destacan por su capacidad mutagénica y carcinogénica la β -naftilamina y 4-aminobifenil. Su activación metabólica se realiza por diferentes reacciones enzimáticas (Stollar, 1981). Mencionamos la N-acetilación, N-deacetilación, N-hidroxilación. La N-hidroxilación da lugar a las N-hidroxiarilaminas, que tras su conjugación con el ácido glucurónico originan N-glucurónidos, que se detectan como tales en orina. Estos conjugados se hidrolizan a pH ligeramente ácido (Evans, 1983) y la hidroxilamina

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

formada pierde agua espontáneamente y da lugar a un compuesto electrofílico que se une a macromoléculas como el ADN. La carcinogénesis a través de esta vía tiene lugar típicamente en vejiga.

En otros casos las arilaminas o las hidroxiarilaminas son acetiladas (de modo polimórfico) y dan lugar a las arilacetamidas, hidroxiarilacetamidas o ácido arilhidroxámico, respectivamente (Weber, 1985), que no intervienen en la génesis del cáncer de vejiga, pero pueden afectar a otras estructuras.

Benceno

Su poder carcinógeno se debe a los metabolitos intermedios formados tras la incorporación de oxígeno (reacción catalizada por una monooxigenasa) y a la formación de compuestos epóxidos, de carácter electrofílico, como ocurre con el benzopireno (Hinson, 1985).

En resumen, diversos compuestos presentes en el humo del tabaco pueden dar lugar -tras diferentes transformaciones metabólicas- a reactantes electrofílicos que establecen uniones covalentes con diversas macromoléculas (como ADN, ARN y distintas proteínas celulares). Una característica común a muchas de estas reacciones transformadoras es la de aumentar la polaridad e hidrosolubilidad del compuesto (OMS, 1981), a fin de facilitar su excreción del organismo.

En este complejo entramado de vías metabólicas intervienen otras variables como *inducción enzimática*, por la que aumenta la actividad de un determinado enzima; o por el contrario, *inhibición enzimática* e inducción de vías alternativas (Merck, 1984).

Existe una vía metabólica constituida por las oxidasas de función mixta, que tiene la particularidad de originar en muchos casos metabolitos de toxicidad creciente (Merck, 1984).

TABLA 1
CARCINOGENOS PULMONARES IMPLICADOS

CARCINOGENO	CONOCIDO	PROBABLE
Acrilonitrilo	x	
Cloruro de vinilo	x	
2-Naftilamina	x	
4-aminobifenil	x	
Arsénico	x	
Benceno	x	
Benzopireno		x
Formaldehido		x
Hidracina		x
N-nitrosodimetil-amina		x
Niquel		x
Cadmio		x

SECCION 3:

**VARIACIONES EN METABOLISMO DE
XENOBIOTICOS**

VARIACIONES EN METABOLISMO DE XENOBIOTICOS

Se consideran xenobióticos aquellas sustancias de origen biológico endógenas o exógenas que no intervienen como fuente de energía ni como elemento estructural.

La capacidad de eliminación de medicamentos u otros xenobióticos depende de factores genéticos y ambientales. Existe una amplia variación interindividual en el metabolismo y eliminación de muchas sustancias. La capacidad individual para metabolizar algunos compuestos químicos está sujeta a variaciones genéticas y ambientales (Lennard, 1986; Jacqz, 1986). Sobre los factores genéticos se conocen pocos datos en la actualidad. Los primeros estudios sobre variaciones genéticas en el metabolismo de fármacos fueron realizados por Hughes y cols. en 1.954 sobre N-acetilación de isoniazida (Hughes 1.954).

Las diferencias genéticas de tipo farmacocinético se deben a cambios en un enzima que controla el metabolismo de un fármaco. Según los casos, puede producirse el acúmulo de la sustancia lo que causa toxicidad o ineficacia relativas (Goth, 1986). Las

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

diferencias fenotípicas pueden ser expresadas farmacogenéticamente en términos de concentraciones plasmáticas del fármaco, relación entre fármaco y sus metabolitos (índice metabólico), aclaramiento y vida media del fármaco.

La actividad de una serie de enzimas que participan en el metabolismo de xenobióticos es regulada monogénicamente (Nakamura, 1985) y exhibe un polimorfismo genético; es decir, diferentes alelos de un mismo gen pueden afectar el funcionamiento de un enzima y por ello afecta a la capacidad de una vía metabólica de fármacos o sustancias químicas ambientales (Clark, 1985). El término *polimorfismo genético* hace referencia a un rasgo monogénico autosómico o mendeliano existente en la población en al menos 2 fenotipos, ninguno de los cuales es raro (presenta una frecuencia superior al 1-2%) (Vogel, 1979).

OXIDACIÓN DE XENOBIÓTICOS

En el metabolismo de sustancias para formar compuestos hidrosolubles intervienen gran variedad de reacciones químicas. Tanto las reacciones de fase I como las de fase II son importantes en el metabolismo de carcinógenos y otros xenobióticos.

En las reacciones de fase I se introducen grupos polares en las moléculas de la sustancia por oxidación, reducción o hidrólisis. De estas vías, la oxidación es con mucha diferencia la más importante. Incluye a un grupo de enzimas oxidativas llamadas oxidasas de función mixta o monooxigenasas del citocromo P-450 microsomal. Las reacciones de fase II se relacionan con reacciones de conjugación y detoxificación de xenobióticos (Sjöquist, 1983; Roomi, 1985).

La oxidación es la vía de biotransformación más frecuentemente utilizada en la metabolización de fármacos y agentes químicos diversos. Es una biotransformación de tipo I. La mayoría de reacciones de oxidación se llevan a cabo por los isoenzimas del citocromo P-450.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

En lo que a oxidación de fármacos se refiere, los polimorfismos genéticos ocasionan una biotransformación deficiente de determinados fármacos en ciertos sujetos denominados así *metabolizadores deficientes* (PM).

Los estudios sobre variaciones genéticas en metabolismo oxidativo se iniciaron en 1.975, apareciendo posteriormente 2 publicaciones casi simultáneas sobre defectos genéticos asociados a la oxidación de debrisoquina (Mahgoub 1.977) y esparteína (Eichelbaum 1.977).

Sobre la variabilidad genética en el polimorfismo oxidativo y sobre la función de los citocromos P-450 se han publicado varias revisiones en los últimos años (Eichelbaum 1.982; Clark 1.985; Larrey 1.985; Jacqz 1.986; Roots 1.987; Kalow 1.987; Nebert & González 1.987).

En los siguientes apartados comentaremos aspectos de interés correspondientes a 2 cuestiones particulares dentro del amplio campo de la oxidación de xenobióticos: el citocromo P-450 hepático y el polimorfismo oxidativo de la debrisoquina.

SECCION A:

SISTEMA CITOCROMO P-450 HEPATICO

SISTEMA CITOCROMO P-450 HEPÁTICO

El sistema citocromo P-450 es un complejo conjunto de enzimas (sistema monooxigenasa) responsable del metabolismo oxidativo de un gran número de sustancias endógenas y xenobióticas con capacidad de actuación sobre múltiples sustratos. Su localización intracelular tiene lugar en los microsomas. La denominación citocromo P-450 se debe a que su punto de absorción máxima tiene lugar a 450 nanómetros en su forma reducida en presencia de monóxido de carbono.

Su función es la oxidación de un compuesto, transfiriendo un átomo de oxígeno a partir de oxígeno molecular, mientras el otro es reducido a agua. Este destino doble de los dos átomos de oxígeno explica los términos 'oxidasas de función mixta' o 'monooxigenasa', introducido por primera vez por Hayaishi (1962).

Los citocromos P-450 son hemoproteínas que participan en el último paso de las cascadas de transferencia de energía, captando un electrón (donado casi siempre por el NADPH, y más raramente por el NADH) y donando un átomo de oxígeno al sustrato. Los citocromos P-450

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

constituyen moléculas de aparición extraordinariamente precoz en la filogénesis, hace mil millones de años, y presentes en bacterias, plantas y animales.

Se trata de un sistema plurienzimático, en el que existe:

- fuente de electrones (NADPH)
- sistema de transporte de electrones (Citocromo P-450 reductasa)
- hemoproteína catalítica que realiza la reacción de oxidación

Tras su acción produce 2 tipos principales de metabolitos eventualmente tóxicos: electrofílicos y radicales libres.

1. Electrofílicos: el citocromo P-450 produce electrofílicos por la oxidación de fármacos, sustancias con capacidad alquilante o arilante, que se unen covalentemente a nucleótidos. El principal nucleófilo es el grupo tiol de la cisteína, componente de

macromoléculas, y los grupos SH, OH y NH₂ de proteínas diversas y de ADN y ARN.

2. Radicales libres: los metabolitos con un electrón no emparejado son producidos por reacciones oxidativas o reductoras del citocromo. Normalmente, uno o dos electrones son cedidos por las moléculas del NADPH por una reductasa a la forma férrica del hemo, que transfiere los electrones al oxígeno enlazado a la enzima. En ausencia de oxígeno, un electrón es cedido directamente por el citocromo P-450 al fármaco (Kaplowitz, 1986).

Las reacciones catalizadas por estas oxigenasas microsomales incluyen: N-dealquilación, O-dealquilación, hidroxilación de un anillo aromático y una cadena lateral, N-oxidación y otras mencionadas en la tabla 2

TABLA 2
REACCIONES CATALIZADAS POR OXIGENASAS MICROSOMALES

N-desalquilación	
O-desalquilación	
Hidroxilación de un anillo aromático y una cadena lateral	
N-oxidación	
N-hidroxilación	
Formación de sulfóxidos	
Desulfuración	(Desaminación de aminas primarias y secundarias y reemplazo de un átomo de azufre por otro de oxígeno)

(Benet 1986).

Localización

La mayoría de reacciones oxidativas, por tanto, son realizadas por un sistema microsomal multienzimático situado en el citocromo P-450, que se localiza principal pero no exclusivamente en el hígado (en el retículo endoplásmico). También se encuentra en células intestinales (Dubey, 1988), riñón, suprarrenales, piel, pulmón, ovario, páncreas y placenta (Vainio, 1980). Recientemente se ha descrito en algunas neuronas y células gliales de rata (Köhler 1.988).

Ciclo catalítico del citocromo P-450

Las etapas sucesivas de la reacción de oxidación son las siguientes:

1. Interacción de del sustrato xenobiótico con el citocromo P-450

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

2. El complejo citocromo P-450 + sustrato formado es reducido por un electrón cedido por el NADPH

3. El complejo citocromo P-450 + sustrato reducido reacciona con oxígeno molecular para formar nuevamente un complejo oxidado

4. El complejo se reduce mediante un electrón proveniente del NADPH, vía citocromo b5

5. A continuación tiene lugar una reoxidación y formación de oxígeno activo, altamente inestable

6. Se descompone el oxígeno activado para formar un sustrato oxidado y recuperar el citocromo P-450 en su forma inicial oxidada

Las diferentes isoenzimas del citocromo P-450 están presentes simultáneamente en el retículo endoplásmico celular, de forma que las actividades enzimáticas detectadas son el resultado del conjunto de actividades separadas de cada una de las formas. Así, el citocromo P-450 muestra una especificidad muy amplia (Heinonen, 1984; Oesch, 1984).

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

El sistema citocromo P-450 interviene en la oxidación de numerosos componentes endógenos, tales como esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, leucotrienos y aminas biógenas, así como de múltiples sustancias exógenas, como vitaminas, drogas, tóxicos y carcinógenos.

Algunos citocromos P-450 ostentan funciones específicas como la hidroxilación de hormonas esteroideas (Jefconte, 1986), al tiempo que otros son inespecíficos.

Isoenzimas del citocromo P-450

Se conocen numerosos isoenzimas del citocromo P-450. En la rata existen al menos 12 miembros aislados y diferenciados. Estos tienen en común la presencia en su molécula del grupo hem. Las cadenas de aminoácidos próximas al hem son también, con pequeñas diferencias, muy similares entre sí. Dentro de estas isoenzimas la principal diferencia estructural está en los restantes aminoácidos.

Por otro lado, los distintos isoenzimas del citocromo P-450 se diferencian entre sí también por reacciones

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

inmunoquímicas diferentes (se han descrito anticuerpos específicos contra alguno de ellos), y diferencias en peso molecular, movilidad electroforética, especificidad sexual y especificidad de sustrato (con algunas superposiciones). Por último, existen diferencias en agentes inductores y en el grado de inducibilidad y de bloqueabilidad (Tabla 3) .

Más recientemente se han descrito mediante estudio más refinado diferencias suplementarias en el análisis de aminoácidos, modificaciones posttranslacionales y en secuencias N-terminal y C-terminal.

Todas estas isoenzimas comparten el paso final del citocromo P-450.

Variaciones en la actividad del P-450

La capacidad catalítica del sistema citocromo P-450 está sujeta a múltiples influencias (Ruckpaul, 1985). Se sabe hace muchos años que el retículo endoplásmico de células hepáticas de múltiples especies animales contiene múltiples citocromos P-450. Este sistema puede

TABLA 3

DIFERENCIAS ENTRE ISOENZIMAS DEL CITOCROMO P-450

-
- * Peso molecular
 - * Movilidad electroforética
 - * Especificidad sexual
 - * Especificidad de sustrato (con superposiciones)

 - * Agentes inductores
 - * Grado de inducibilidad y bloqueabilidad
 - * Anticuerpos específicos diferentes

 - * Secuencias de aminoácidos
 - * Secuencia N-terminal y C-terminal
-

ser inducido por determinados fármacos. Inductores clásicos del sistema microsomal son el fenobarbital y el metilcolantreno.

Genética del sistema citocromo P-450

En los últimos años se han descubierto defectos transmitidos monogénicamente para diferentes isoenzimas del citocromo P-450. Los individuos afectados tienen una capacidad reducida para la metabolización de ciertos sustratos. Se atribuye esta metabolización deficiente a la ausencia o incapacidad funcional de un determinado isoenzima. Cada uno de estos defectos es controlado por 2 alelos situados en un locus de un gen.

Se consideran *aloenzimas* aquellos productos de alelos diferentes dentro de un mismo locus génico. Las *isoenzimas*, en cambio, son enzimas similares que difieren solo en unos pocos constituyentes, pero que son sintetizados por genes diferentes. Los miembros equivalentes del sistema citocromo P-450 de distintas especies pueden mostrar más similitudes que miembros de

diferentes familias dentro de una misma especie (Kalow, 1987).

Se sabe que los genes se duplican frecuentemente durante la replicación del ADN (genes gemelos). A veces ambos gemelos permanecen activos, mientras que otras veces uno de los genes se hace inactivo, siendo conocido en este caso como pseudogen.

Los genes que codifican la síntesis de los diferentes isoenzimas del citocromo P-450 constituyen realmente una auténtica "superfamilia", que incluye al menos 10 familias de genes y probablemente un total de más de 100 genes y pseudogenes. Estas familias son distinguibles entre sí debido a que la homología de aminoácidos es inferior al 35%. Dentro de una misma familia los miembros comparten una similitud de aminoácidos que oscila entre 50-98% (Nebert, 1987).

Las familias de genes P-450 que presentan mayor actividad a nivel hepático son las I, II, III y IV, cuyas características están resumidas en la tabla 4.

Nos centraremos especialmente en un subgrupo de la familia II: la subfamilia IID.

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

La subfamilia IID se ha conocido recientemente. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 22 (Eichelbaum 1.987), próximo al protooncogen *c-sis* y al grupo sanguíneo P_i. Esta subfamilia incluye 2 genes P-450-dbl y P-450-db2. El P-450-dbl está claramente implicado en la metabolización (vía oxidación) de debrisoquina (de aquí el sufijo db), que será comentada más extensamente a continuación. La función del gen P-450-db2 es desconocida.

Se sabe que el gen P-450-dbl es polimórfico.

Es interesante mencionar que la isoenzima responsable de la hidroxilación de debrisoquina representa menos del 1% del sistema citocromo P-450, de forma que la deficiencia de esta enzima no ocasiona una deficiencia medible del conjunto del citocromo P-450.

TABLA 4

FAMILIAS DE GENES DEL CITOCROMO P-450

FAMILIA I

- Inducida por compuestos aromáticos policíclicos.
- = Localización cromosómica en 15 q 22-qter.
- * Consta de 2 genes:
 - P₄₅₀ (hidroxilación de benzopireno).
 - P₄₅₀ (hidroxilación de 2-acetil-aminofluorano y estrógenos).

FAMILIA II

Subfamilia A

- Localización cromosómica en 19q13,1-13,3
- = Consta de 1 gen:
 - P-450a (7- α -hidroxilación de testosterona).

Subfamilia B

- Localización cromosómica en cromosoma 19
- = Consta de 1 gen:
 - P-450b.
- * Inducido por fenobarbital

Subfamilia C

- Localización en cromosoma 10
- = Consta de 1 gen:
 - P-450mp.

Subfamilia D

- Localización cromosómica en 22q11,2-qter
- = Consta de 2 genes:
 - P-450-db1 (metabolismo de debrisoquina y fármacos relacionados).
 - P-450-db2 (función desconocida).

Subfamilia E

- Localización en cromosoma 10
- = Consta de 1 gen
 - P-450j (metabolismo de etanol, anilina, halotano, nitrosaminas, etc)

FAMILIA III

- = Localización cromosómica en 7p
- = Consta de 1 gen:
 - P-450nf.
- * Inducida por esteroides

FAMILIA IV

- = Localización cromosómica no conocida
- * Consta de 1 gen:
 - P-450L ω (ω -oxidación del ácido láurico)
- * Inducida por clofibrato

(Nebert & González 1.987)

SECCION 5:

POLIMORFISMO OXIDATIVO DE DEBRISOQUINA

POLIMORFISMO OXIDATIVO DE DEBRISOQUINA

La debrisoquina (*Declinax*) es un fármaco simpaticolítico (bloqueante adrenérgico) que ha sido empleado para el tratamiento de la hipertensión arterial. En la actualidad está comercializado en algunos países de Europa y en Canadá, pero no en Estados Unidos ni en España. Este fármaco se metaboliza predominantemente por vía oxidativa, dando como resultado diversos metabolitos hidroxilados. Cuantitativamente el metabolito más importante es la 4-hidroxi-debrisoquina, que se elimina por orina.

El primer trabajo sobre polimorfismo oxidativo de debrisoquina fue realizado por Mahgoub y cols. (Mahgoub 1.977). Estos autores demostraron una distribución bimodal (simétrica tras una transformación logarítmica) en la eficacia de la hidroxilación de debrisoquina en la población inglesa de raza blanca, de modo que un pequeño porcentaje de individuos la eliminan lentamente ("poor metabolizers" o "metabolizadores lentos"), mientras que la mayoría de la población lo hacen

rápidamente ("extensive metabolizers" o "metabolizadores rápidos").

La inmensa mayoría de la población (algo más del 90%) posee una versión activa del gen, mientras que el resto presenta un gen mucho menos activo o inactivo. En el primer caso los individuos son metabolizadores rápidos, el resto son metabolizadores lentos.

Según estos autores, los metabolizadores rápidos presentan una capacidad de oxidación de debrisoquina grande y rápida, exhibiendo cocientes metabólicos en el rango 0.01-1. Los sujetos con fenotipo oxidativo lento (o defectuoso) excretan menos del 2% de metabolitos y tienen cocientes metabólicos en el rango 18-200). Por tanto, la capacidad de metabolización de debrisoquina, el cociente metabólico, tiene una variación interindividual extremada: alrededor de 20.000 veces entre el cociente metabólico más elevado y el más disminuido. Sin embargo, la capacidad absoluta varía en menor medida: la capacidad metabolizadora de debrisoquina oscila entre 10 a 200 veces.

Es importante reseñar que la vida media de la debrisoquina no difiere en metabolizadores lentos o rápidos, aunque puede existir una diferencia de niveles

plasmáticos de 4 veces (Kalow, 1987). En individuos con enzima activo hasta un 70-80% del medicamento es destruido en el hígado antes de penetrar en la circulación general. En metabolizadores lentos no existe tal grado de eliminación hepática, de forma que el nivel plasmático de debrisoquina es mucho más elevado.

Los individuos con fenotipo metabolizador lento pueden presentar tras el tratamiento con debrisoquina una toxicidad aguda marcada con ataxia e hipotensión severa.

La isoenzima P-450 db1, responsable de la oxidación de debrisoquina, no es inducible por xenobióticos exógenos, incluyendo fármacos, alcohol y tabaco (Steiner, 1985; Eichelbaum, 1986). Sin embargo, este enzima es susceptible de bloqueo competitivo por sus propios sustratos (Fonne-Pfister, 1988) o, por diversos fármacos como cimetidina y quinidina. Este hecho debe ser tenido en cuenta a la hora de incluir pacientes para determinación de fenotipo oxidativo.

Distribución según etnias

La frecuencia del fenotipo metabolizador lento de debrisoquina presenta importantes diferencias raciales, oscilando entre el 0 % en japoneses y el 31.6 % en nativos de Hong-Kong residentes en Canadá (tabla 5). La deficiencia en el metabolismo de debrisoquina ocurre más frecuentemente en la raza caucásica (6-10%). Es más rara en otras poblaciones, probablemente un 2% en poblaciones orientales y aproximadamente 1% en Arabia. Datos de Nigeria y Ghana sugieren que los criterios por los que se establece el defecto pueden ser diferentes a los europeos.

En el caso concreto de la población española esta frecuencia es del 5.4 % (Benítez 1.986).

Es interesante mencionar que aunque la prevalencia de fenotipo metabolizador lento varía entre grupos étnicos, siempre es minoritaria.

Además, pueden existir diferencias en la asociación entre debrisoquina y esparteína en algunos países africanos (véase más adelante).

Genética del polimorfismo oxidativo

Estudios familiares realizados por Price-Evans y cols. (Price-Evans 1.980) demostraron que la 4-hidroxilación de debrisoquina está controlada por un par de alelos. El carácter metabolizador lento se transmite por herencia autosómica recesiva, por lo que todos los individuos que lo presentan necesariamente son homocigotos. El carácter metabolizador rápido parece transmitirse por herencia autosómica dominante (con penetrancia incompleta), existiendo individuos tanto homo como heterocigotos. En éstos últimos se ha observado en algunas poblaciones (p. ej. Ghana) una capacidad intermedia en la hidroxilación de debrisoquina. La distribución en dichas poblaciones podría ser, pues, trimodal (Woolhouse 1.979).

En el fenotipo metabolizador lento existe una disminución de actividad del isoenzima del citocromo P-450 responsable de la oxidación de un determinado fármaco. Esta disminución de actividad puede ser el resultado de distintos tipos de alteraciones genéticas (Jacqz 1.986):

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

1) Mutación de genes *estructurales*, que alteraría la unión de la fármaco al sitio activo del isoenzima o reducir su estabilidad, haciendo que el enzima sea funcionalmente deficitario.

2) Mutación de genes *reguladores*, que puede alterar el grado de síntesis o degradación del enzima que llevaría a la aparente ausencia de un isoenzima específico.

3) Mutación de genes *próximos*, que podría controlar la presencia de inhibidores de la síntesis o de la actividad del enzima. Esta última hipótesis puede explicar el defecto de hidroxilación de debrisoquina en ratas hembras *dark-adapted* (ver más adelante).

Polimorfismo oxidativo de esparteína

Paralelamente a los estudios iniciales con debrisoquina, Eichelbaum y cols. (Eichelbaum 1.979) demostraron la existencia de un déficit de metabolismo oxidativo de esparteína (fármaco antiaritmico y oxiótico) en el 5 % de la población alemana. Se observó poco tiempo después que ambos déficits metabólicos se correlacionaban con frecuencia, sugiriendo un mismo polimorfismo (Bertilsson 1.980; Inaba 1.980; Eichelbaum 1.982; Inaba 1.983; Evans 1.983). También serían datos favorables a esta hipótesis de un mismo isoenzima del sistema citocromo P-450 sería responsable a la vez de la oxidación de debrisoquina y esparteína, el hecho de que la purificación enzimática no divida las dos actividades (Guengerich 1.986) y de que distintos tipos de inhibidores enzimáticos inhiban por igual la oxidación de ambos fármacos (Inaba 1.984).

Sin embargo, se ha descrito excepciones: en algunas poblaciones, como la de Ghana, se ha comunicado la independencia de ambos déficits metabólicos, de modo

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

que los metabolizadores lentos de debrisoquina metabolizan con normalidad la esparteína (Woolhouse 1.979; Eichelbaum 1.985). Este último hecho sugeriría que posiblemente existan diferentes aloenzimas de debrisoquina-hidroxilasa que serían comunes a varias poblaciones, y que en algunas etnias participarían otros sistemas enzimáticos para metabolizar la esparteína. Es posible que la deficiencia en el metabolismo de la esparteína sea debida a una diferencia estructural del citocromo responsable

El polimorfismo oxidativo de debrisoquina/esparteína afecta también al metabolismo oxidativo de algunos medicamentos (tabla 6), mientras que hay otros que también sufren metabolismo oxidativo independiente de la debrisoquina (tabla 7). Este hecho se ha conocido tanto a partir de estudios *in vivo* como de estudios *in vitro* con microsomas de hígado humano.

TABLA 5
VARIACIONES INTERÉTNICAS EN LA PREVALENCIA DE
METABOLIZADORES LENTOS HOMÓZIGOTOS DE DEBRISOQUINA

PAIS	Nº CASOS	% METAB LENTOS	AUTORES
Japón	100	0	Nakamura y cols. 1.985
China	269	0.7	Lou y cols. 1.987
Arabia Saudí	102	1.0	Islam y cols. 1.980
Egipto	72	1.4	Mahgoub y cols. 1.979
India (Bombay)	147	2.0	Idle & Smith 1.984
Inglaterra	94	3.2	Mahgoub y cols. 1.977
Iraq	260	3.5	Idle & Smith 1.984
Finlandia (fineses)	156	3.9	Arvela y cols. 1.986
España	130	5.4	Benítez y cols. 1.986
Ghana	80	6.0	Woolhouse y cols. 1.979
Canadá (caucasianos)	48	6.3	Inaba y cols. 1.981
Inglaterra	145	7.0	Tucker y cols. 1.977
Nigeria	123	8.1	Mbanefo y cols. 1.980
Inglaterra	258	8.9	Evans y cols. 1.980
Suecia	226	9.4	Steiner y cols. 1.985
Alemania	270	10.0	Roots y cols. 1.987
Finlandia (lapones)	58	10.3	Arvela y cols. 1.986
Canadá (nativos de Hong-Kong)	19	31.6	Inaba y cols. 1.981

(modificado de Kalow y cols. 1.982 y Roots y cols. 1.987)

TABLA 6
FARMACOS SUJETOS A METABOLISMO VARIABLE
SEGUN POLIMORFISMO OXIDATIVO DE DEBRISOQUINA

1. BLOQUEANTES BETA ADRENERGICOS

Alprenolol	Pindolol
Metoprolol	Bufuralol
Propranolol	Penbutolol
Bopindolol	Labetalol
Oxprenolol	Pindolol

2. OTRAS DROGAS CARDIOVASCULARES

Ajmalina	Quinidina
Guanoxan	Debrisoquina
Propafenona	Mexiletina
Captopril	Yohimbina
Lidocaína	Encainida
Quinina	N-propil-ajmalina
Clonidina	Esparteina
Metoxibenzamina	Perhexilina

3. DROGAS PSICOTROPICAS

Amiflamina	Haloperidol
Domperidona	Desipramina
Pipasperona	Imipramina
Amitriptilina	Nortriptilina*
Flurazepam	Dextrometorfán
P-metoxiamfeta-	Oxazepam
Clorpromazina	Temazepam

(*) Hidroxilación E-10

4. OTRAS DROGAS

Fenacetina
 Lobelina
 Metoxiamfetamina
 Fenformina
 Metiamida
 Paracetamol

TABLA 7

**FARMACOS SUJETOS A METABOLISMO VARIABLE SEGUN
POLIMORFISMO OXIDATIVO DISTINTO DEL DE DEHIDROGENACION**

Acetanilida	Primidona
Etosuximida	Carboximetilcisteina
Nicotina	Hexametonio
Acido valproico	Procainamida
Fenilbutazona	Colesterol
Nifedipina	Isoproterenol
Amobarbital	Sotalol
Fenilefrina	Clonazepam
Nortriptilina*	Mefenitoína
Antipirina	Teofilina
Fenitoína	Clozapina
Quabaina	Metacualona
Atenolol	Tolbutamida
Fenobarbital	Desalquilflurazepam
Pilocarpina	Metiamida
Cafeína	Tubocurarina
Guanetidina	Escopolamina
Nadolol	Verapamil

* Hidroxilación E-10

SECCION 6:

**CONSECUENCIAS FARMACOLOGICO-CLINICAS
DEL POLIMORFISMO OXIDATIVO DE
DEBRISOQUINA**

CONSECUENCIAS FARMACOLÓGICO-CLÍNICAS DEL FENOTIPO OXIDATIVO DE DEBRISOQUINA

Si el metabolismo oxidativo es defectuoso, cabe pensar que el enzima responsable de una determinada vía metabólica no funciona o su funcionamiento está reducido. Las consecuencias farmacocinéticas serán variables según la importancia de la vía defectuosa en la eliminación de la droga y la existencia o no de rutas alternativas de eliminación.

Como se ha mencionado previamente, existe una distribución bimodal del fenotipo oxidativo de debrisoquina en la población general en 2 grupos diferenciados: oxidadores lentos y rápidos.

Desde el punto de vista clínico, la presencia de un fenotipo de debrisoquina tipo metabolizador lento tiene interés, debido a que otros fármacos pueden ser igualmente metabolizados lentamente. Destacan guanoxan, esparteína, fenacetina, 4-metoxianfetamina, nortrip-

tilina, metoprolol, bufuralol y dextrometorfano. Se ha demostrado que la fenacetina produce metahemoglobinemia en sujetos con fenotipo metabolizador lento (Tablas 6 y 7). Más adelante serán comentados más extensamente la repercusión que el manejo de estos fármacos puede tener en individuos metabolizadores lentos.

Muchos de los sustratos de este complejo sistema enzimático son potentes inhibidores competitivos recíprocos de su metabolismo (Boobis, 1985). Es decir los fármacos que presentan un aclaramiento disminuido en individuos con fenotipo metabolizador lento son también inhibidores competitivos de la 4-hidroxilación de debrisoquina *in vitro*. Este fenómeno ha sido descrito para bufuralol, esparteina, guanoxan y fenformina y permite detectar las sustancias que presumiblemente estarán sujetas a este metabolismo (tabla 8).

Es conveniente señalar que el término *inhibición competitiva* expresa simplemente que un fármaco es capaz de unirse al sitio activo de un enzima que cataliza una determinada reacción, que resulta así inhibida; pero no prueba necesariamente que dicho fármaco es metabolizado por el mismo enzima. Este es el caso de la cimetidina y la quinidina para el P-450 db1.

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

En el caso concreto de la debrisoquina, tras administrar una dosis oral única de 10 mg los niveles plasmáticos y la eliminación urinaria son 3-4 veces mayores en individuos con fenotipo metabolizador lento que si el fenotipo es metabolizador rápido. No obstante, la vida media es igual en ambos (Sloan 1.983), lo que posiblemente se explique por una diferencia en la eliminación del fármaco en su primer paso por el hígado, que llega a ser del 70-80 % en un metabolizador rápido. La administración de debrisoquina a individuos con fenotipo metabolizador lento podría dar lugar a una respuesta hipotensora excesiva tanto en sujetos sanos como en hipertensos. Estos hechos obligarían a reducir la dosis de debrisoquina en metabolizadores lentos a una tercera parte de la convencional.

Consecuencias clínico-terapéuticas

Es importante tener en cuenta los factores que influyen en los requerimientos de los fármacos usados en la clínica. En ciertos casos puede ser preciso individualizar la dosificación (Clark, 1985).

β -bloqueantes

El metoprolol ocasiona un efecto antihipertensivo menor en sujetos hidroxiladores rápidos a igual dosis administrada (Mc Gourty, 1985). Se ha comunicado una mayor toxicidad del bufuralol en individuos con fenotipo oxidativo lento, en relación probablemente con una concentración plasmática mayor (Mc Gourty, 1985). Igual fenómeno parece tener lugar con el timolol.

En el tratamiento con β -bloqueantes del angor pectoris los metabolizadores lentos pueden requerir dosis más bajas y/o a intervalos más prolongados. Asimismo, estos pacientes pueden presentar bradicardia (por bloqueo aumentado de receptores β_1), pérdida o disminución de la cardioselectividad presentando broncoconstricción, astenia, trastornos del sueño, etc (Lennard, 1986) .

Fenitoína

Parece que la parahidroxilación deficiente de fenitoína está, al menos de forma parcial, en relación con el polimorfismo de debrisoquina/esparteína. Así, se

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

ha observado que sujetos metabolizadores lentos presentan una reducción de la producción y eliminación urinaria de metabolitos (Sloan, 1981). Se ha invocado a esta característica farmacogenética para explicar la aparición de toxicidad por acumulación de fenitoína.

Otros autores (Steiner, 1987), en cambio, han afirmado que el fenotipo oxidativo no tiene valor predictivo para la dosificación de fenitoína. Este fármaco no inhibe a la enzima debrisoquina-4-hidroxilasa en microsomas de hígado humano (Spina, 1980) *in vitro*.

Antidepresivos tricíclicos

Algunos antidepresivos tricíclicos son oxidados por el mismo enzima implicado en el polimorfismo oxidativo de debrisoquina (nortriptilina y desipramina). La imipramina y la amitriptilina inhiben el metabolismo de la esparteína en preparaciones de hígado humano (Otton, 1983). Los metabolizadores lentos de debrisoquina presentan una disminución de niveles de

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

hidroxiamitriptilina en sangre y orina (Balant-Gorgia, 1982).

Como quiera que la vía principal de eliminación de la amitriptilina es la demetilación (y no la oxidación), la valoración del fenotipo oxidativo tiene un valor solo relativo en el manejo clínico de este fármaco (Clark, 1985).

Otros fármacos sujetos a oxidación como la amilobarbitona, tolbutamida y guanetidina no inhiben dicho metabolismo.

Las consecuencias clínicas al administrar fármacos que siguen el mismo polimorfismo oxidativo que la debrisoquina están resumidas en la tabla 9.

TABLA 8

**INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS Y POLIMORFISMO
OXIDATIVO DE DEBRISOQUINA Y OTROS FARMACOS**

<u>MODIFICADOR</u>	<u>SUSTRATO</u>	<u>EFEECTO</u>	<u>FENOTIPO</u>	<u>AUTORES</u>
Cimetidina	Desipramina	Inhibidor	Rápido	Steiner y cols. 1.987
Quinidina	Metoprolol	Inhibidor	Rápido	Leenan y cols. 1.986
Quinidina	Debrisoquina	Inhibidor	Rápido	Brosen y cols. 1.987
Rifampicina	Esparteina	Inductor	Rápido	Eichelbaum y cols. 1.986
"Neurolepticos"	Debrisoquina	Inhibidor	Rápido	Syvälähti y cols. 1.986
Clorpromazina	Propranolol	Inhibidor	--	Vertal y cols. 1.979
Fenobarbital	Esparteina	Ninguno	Rápido	Eichelbaum y cols. 1.986
Ambientales *	Debrisoquina	Muy escaso	Ambos	Steiner y cols. 1.985
Carbamazepina	Debrisoquina	Inductor	--	Roots y cols. 1.985
Antihistaminicos	Debrisoquina	Inhibidor	--	Larrey y cols. 1.985 Poirier y cols. 1.987

* Estudio realizado en familias analizando la relación entre consumo de alcohol, tabaco, café, ejercicio físico, stress laboral y otros factores ambientales y el índice metabólico de debrisoquina. Influencia muy escasa, sólo el consumo de cafeína guardaba correlación significativa ($r = -0.19$; $p < 0.01$)

TABLA 9

**CONSECUENCIAS CLINICAS DEL FENOTIPO
OXIDATIVO METABOLIZADOR LENTO**

COMPUESTO	CAMBIOS CLINICOS EN METABOLIZADORES LENTOS
Debrisoquina	Hipotensión ortostática
Esparteína	Contracción uterina; alteraciones visuales
Perhexilina	Neuropatía periférica; hepatotoxicidad
Guanoxán	Hipotensión ortostática
Fenformina	Acidosis láctica
Encainida	Disminución de su eficacia antiarrítmica por
N-propil-ajmalina	Aumento de su eficacia antiarrítmica
Beta-bloqueantes	Aumento parcial de su eficacia
Captopril	Posible agranulocitosis
Nortriptilina	Neurotoxicidad
Indoramina	Aumento de eficacia
Dextrometorfán	Ningún cambio
Desipramina	Ningún cambio
Amitriptilina	Ningún cambio
Amfetamina	Ningún cambio
Metoxiamfetamina	Ningún cambio
Amiflamina	Ningún cambio

(modificado de Roots y cols. 1.987 y Kalow 1.987)

SECCION 7:

**RELACION ENTRE FENOTIPO OXIDATIVO
DE DEBRISOQUINA
Y PATOLOGIA CLINICA**

FENOTIPO OXIDATIVO DE DEBRISOQUINA Y NEOPLASIAS

Se han realizado estudios en diversos tipos de cánceres, cuyos resultados están resumidos en la tabla 10.

Metabolismo oxidativo de carcinógenos

Se acepta que cierto número de tumores en el ser humano están asociados con la exposición a carcinógenos químicos ambientales (Miller, 1974). Diversas sustancias naturales son carcinógenos reconocidos, entre los que destacan: aflatoxinas, alcaloides de pirroizilidina, nitrosaminas e hidrocarburos aromáticos policíclicos.

La carcinogénesis química es un proceso extraordinariamente complejo en el que intervienen una plétora de factores genéticos, ambientales, fisiológicos y patológicos. Los sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo de drogas también intervienen en el metabolismo de otros xenobióticos, incluyendo carcinógenos. Se sabe en la actualidad que

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

muchos carcinógenos químicos son inactivos *per se*. La elaboración de carcinógenos a partir de precarcinógenos transcurre en algunos casos por vía oxidativa. De hecho así sucede en algunos casos. Ejemplos de carcinógenos activados por oxidación incluyen benzo(a)pireno, benzantraceno, dimetilnitrosamina, acetaminofluoreno y aflatoxina B1.

Esta última toxina, por ejemplo, es convertida -vía oxidativa- en aflatoxina B1-2,3-óxido, que es un metabolito que reacciona de forma covalente con los ácidos nucleicos celulares, proceso este último relacionado con la tumorigénesis. El metabolismo oxidativo podría ser, pues, un factor en la carcinogénesis química.

De forma un tanto esquemática, los sujetos con fenotipo metabolizador lento para una determinada isoenzima tendrían una capacidad deficiente de formación de carcinógenos activos, a partir de los productos que siguen una vía específica. Teóricamente presentarían, pues, un menor riesgo de padecer determinados tipos de cánceres. Por el contrario, los sujetos con una tasa oxidativa muy elevada generarían

más carcinógenos inmediatos a partir de los procarcinógenos que siguen esa vía.

Parece, por tanto, de gran interés establecer si, para una comunidad, la población de pacientes portadores de determinada neoplasia presentan una frecuencia de fenotipo metabolizador lento distinta a la la población normal dentro de esa misma comunidad.

Planteamos el problema en los siguientes términos:

¿Existen diferencias genéticas en la susceptibilidad a padecer determinados tumores?

Si existen *¿pueden atribuirse a la variación en la capacidad oxidativa?*

Y en caso afirmativo *¿cuál es la isoenzima (o isoenzimas) involucrada(s) en estas diferencias genéticamente determinadas ?*

¿Qué carcinógeno o carcinógenos presentes en el tabaco siguen estas vías?

¿Es quizá una de esas vías la vía del isoenzima polimórfico db-1?

En los párrafos siguientes resumimos los conocimientos adquiridos al respecto en relación con la isoenzima db-1 del sistema oxidativo microsomal dependiente del citocromo P-450.

TABLA 10

**ESTUDIOS VALORANDO ASOCIACION DE NEOPLASIAS CON
POLIMORFISMO OXIDATIVO DE DEBRISOQUINA**

ENFERMEDAD	OBSERVACION	AUTORES
Carcinoma bronquial	Baja frecuencia de PM	Heizel y cols. 1.980
	Baja frecuencia de PM	Ayesh y cols. 1.984
	Sin cambios	Drakoulis y cols. 1.986
	Baja frecuencia de PM	Law, 1989
	Sin cambios	Speirs, 1990
Cáncer laríngeo	Baja frecuencia de PM	Ritter y cols. 1.986
Cáncer faríngeo	Baja frecuencia de IM*	Ritter y cols. 1.986
Cáncer gástrico	Baja frecuencia de PM	Roots y cols. 1.987
Cáncer de vejiga	Baja frecuencia de PM	Cartwright y cols. 1.984
	Baja frecuencia de PM	Branch y cols. 1.985
	Baja frecuencia de PM	Roots y cols. 1.987
	Baja frecuencia de PM	Kaisary y cols. 1.987
	Baja frecuencia de PM	Benítez y cols. 1987
Hepatoma	Baja frecuencia de PM	Idle y cols. 1.981
Linfomas	Sin cambios	Philip y cols. 1.987

* Fenotipo oxidativo intermedio

PM = metabolizador lento (poor metabol.)

Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la neoplasia más frecuente en la actualidad en los países desarrollados en varones y la segunda en mujeres. Teniendo en cuenta su probada asociación con el tabaquismo, parece que constituye un modelo clínico de carcinogénesis química. La posibilidad de una predisposición genética al cáncer de pulmón, relacionada con el metabolismo de carcinógenos ya fue valorada por Kellermann (1973), sugiriendo una inducibilidad aumentada de la actividad de la enzima aril-hidrocarburo-hidroxilasa en linfocitos. Posteriormente esta hipótesis ha sido objeto de gran discusión (Kouri, 1982). Se ha cuestionado la metodología del primer estudio y por otro lado se ha afirmado que la inducibilidad aumentada de esta enzima en pacientes afectados sería más una consecuencia del cáncer de pulmón que un factor predisponente al mismo.

Existe una larga lista de vías patogénicas con posible relación con el cáncer de pulmón (tabla 11). A la citada enzima aril-hidrocarburo-hidroxilasa, se une la deficiencia de glutatión-transferasa (Seidegard,

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

1983); formación aumentada de de benzo-pireno (DNA adducts) (Rüdiger, 1985); ciertos oncogenes (Boehm, 1985); síndromes hereditarios de inestabilidad cromosómica o de puntos frágiles cromosómicos (Iannuzzi, 1986); o variaciones en HLA B44 (Markman, 1982), W19 y A5 (Dellon, 1975). (Tabla 11)

El primer trabajo realizado para valorar el fenotipo oxidativo de debrisoquina como factor implicado en la génesis del cáncer de pulmón, se debió a Hetzel y cols. (Hetzel 1.980). Estos autores encontraron una disminución significativa de fenotipo metabolizador lento en sujetos con cáncer de pulmón con respecto a controles. Los individuos metabolizadores lentos tendrían una incidencia 4-5 veces menor de carcinoma bronquial. Igualmente Ayesb (1984) observó una disminución de fenotipo metabolizador lento (6 veces menos) en esta neoplasia. Como objeción a este estudio cabe señalar (Boobis, 1989) que presentaba una frecuencia de metabolizadores lentos excesivamente pequeña en el grupo control.

Un estudio alemán con una amplia casuística (n = 270 pacientes) no encontró, en cambio, asociación

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

significativa entre fenotipo oxidativo y cáncer de pulmón en comparación con un grupo control (Roots, 1988).

El estudio de Law (Law, 1989) objetivó (con una diferencia estadística pequeña) una disminución de individuos con fenotipo metabolizador lento en pacientes afectados respecto a los controles. Según sus resultados, los pacientes fumadores con cáncer de pulmón y fenotipo metabolizador lento tendrían un riesgo 1/5 inferior al de los sujetos con fenotipo metabolizador rápido.

El último trabajo publicado hasta la fecha proporciona nuevamente datos contradictorios, no encontrando relación entre fenotipo oxidativo rápido y cáncer de pulmón (Speirs, 1990).

Por otro lado, para fenotipo oxidativo, estudios experimentales en animales muestran que la actividad mono-oxigenasa puede aparecer disminuida por la presencia del cáncer (Rosso, 1971), de forma que este sesgo en todo caso iría en contra de la hipótesis de una capacidad oxidativa aumentada en los pacientes con cáncer de pulmón.

TABLA 11

POSIBLES VIAS PATOGENICAS EN CANCER DE PULMON
(Hipótesis genética)

Inducibilidad aumentada de la aril-hidrocarbon hidroxilasa
Deficiencia de glutathion transferasa
Formación aumentada de benzopireno
Variaciones en HLA B44, V19, A5
Puntos cromosómicos frágiles
Oncogenes celulares

Más adelante -en la *Discusión*- analizaremos más minuciosamente este problema.

Cáncer de tracto gastrointestinal e hígado

En la misma línea teórica, se ha propuesto que el aumento de susceptibilidad (5-40 veces mayor) al carcinoma hepatocelular y del tracto gastrointestinal en individuos con fenotipo metabolizador rápido de debrisoquina, podría estar en relación con un aumento de hidroxilación de contaminantes de la dieta como la aflatoxina (Idle 1.981). En este estudio, el grupo de pacientes con tumores presentaba una proporción desproporcionadamente grande de individuos con fenotipo metabolizador rápido respecto a la población control.

Existen, sin embargo, problemas teóricos a la hora de explicar la patogénesis de estas neoplasias. Estudios recientes han demostrado que el hepatocarcinógeno 2-acetil-aminofluoreno, implicado en la génesis del hepatocarcinoma, se metaboliza por isoenzimas de otra familia (familia I) en el amplio sistema citocromo P-

450. Su metabolismo sería independiente de la hidroxilación de debrisoquina (McManus 1.987).

Presumiblemente el tejido tumoral carecería de capacidad oxidativa per se, y por ello sería una condición favorecedora de un metabolismo disminuido. Esto parece lo esperable en el caso de metástasis hepáticas o de hepatoma. En cambio, los estudios realizados sugieren un predominio de fenotipo metabolizador rápido de debrisoquina en hepatoma (Idle, 1981).

También los estudios de Roots (1987) objetivaron una frecuencia baja de metabolizadores lentos en pacientes con *adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal* (según la clasificación de Lauren), mientras que en el tipo difuso no se observaron diferencias de frecuencia de fenotipo oxidativo. Las frecuencias de metabolizadores lentos entre tipo difuso e intestinal difieren, aunque con una significación estadística marginal, debido al pequeño número de pacientes incluidos. No obstante, si se incluyen los valores metabólicos intermedios ($1.0 < MR < 12.6$), que también están subrepresentados en el tipo intestinal, se encuentra una diferencia significativa. Esta distinción tiene cierta relevancia,

dado que diversos factores como herencia, edad, sexo y carcinógenos ambientales se distribuyen de forma diferente entre subtipos histológicos (Hill, 1983). Esto puede significar que ambos tipos representan, en efecto, diferentes entidades nosológicas.

Cáncer de vejiga

En el caso del cáncer de vejiga, el estudio de Cartwright objetivó una asociación absoluta entre los pacientes (1984) con riesgo industrial (exposición a bencidina). De hecho, no se encontró ningún caso de metabolizador lento. Sin embargo, no se demostró relación alguna con el fenotipo oxidativo en los casos de cáncer de vejiga sin exposición conocida a carcinógenos industriales.

Kaisary (1987) encontró una tasa oxidativa más elevada en pacientes con tumores vesicales de mayor agresividad histológica, frente a tumores menos agresivos

Recientemente, nuestro grupo (Benítez, 1990) ha encontrado un predominio no significativo de oxidadores rápidos.

Otras neoplasias

Un predominio no significativo de metabolizadores rápidos ha sido demostrada también en pacientes con cáncer de *laringe*, pero no de *faringe* (Ritter, 1986).

No se han encontrado diferencias en pacientes con *linfoma* (Philip, 1987)

Fenotipo oxidativo y
enfermedad de Parkinson

Los primeros estudios publicados sobre la hidroxilación de debrisoquina en enfermedad de Parkinson se deben a Barbeau y cols. (Barbeau, 1.985). Basándose en que la enfermedad de Parkinson parece resultar de la acción de factores ambientales sobre individuos genéticamente susceptibles en el contexto del envejecimiento normal, por un lado, y en que determinados xenobióticos pudieran estar relacionados con la etiopatogenia de la enfermedad y de que muchos de estos xenobióticos son metabolizados en el sistema microsomal citocromo P-450 hepático, por otro, estos autores hicieron un estudio preliminar con 40 enfermos parkinsonianos y 40 controles, demostrando un aumento significativo de "metabolizadores intermedios" (IM) y de la suma de IM y metabolizadores lentos en el grupo de pacientes, así como una tendencia de los metabolizadores lentos a tener un comienzo más precoz de la enfermedad.

Posteriormente los mismos autores (Barbeau, 1.986) trataron de establecer una correlación entre el hábito

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

de fumar, que es menor en los enfermos parkinsonianos que en la población general (Baumann, 1.980; Baron, 1.986), la baja incidencia de cáncer en enfermos parkinsonianos (Jansson & Jankovic, 1.985) y el fenotipo oxidativo.

La observación de que los enfermos parkinsonianos eran menos susceptibles a padecer ciertos tipos de cáncer les llevó a la conclusión de que las relaciones inversas Parkinson-tabaquismo y Parkinson-cáncer podrían ser en parte explicadas por el fenotipo oxidativo subyacente. Finalmente en una última publicación (Poirier, 1.987), tras observar que determinados antihistamínicos inhiben el sistema P-450 eliminaron de su serie los enfermos tratados con dichos fármacos, y no confirmaron las diferencias con los controles sanos que habían encontrado en su primer estudio, atribuyendo aquéllos resultados al efecto de la medicación. En cambio si confirmaron la tendencia de los individuos con fenotipo metabolizador lento a tener un comienzo más precoz y un curso más severo de la enfermedad. Una hallazgo similar ha sido comunicado recientemente por nuestro grupo (Benítez, 1990).

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

Un hallazgo de gran interés con respecto a la enfermedad de Parkinson y el fenotipo oxidativo, ha sido la demostración de que la neurotoxina MPTP inhibe competitivamente "in vitro" los isoenzimas del citocromo P-450 responsables de la 4-hidroxilación de debrisoquina (Fonne-Pfister, 1987). Este hecho tiene gran importancia, ya que sugiere la posible relación del citocromo P-450 con el metabolismo y neurotoxicidad del MPTP y con la etiología de la enfermedad de Parkinson.

Fenotipo oxidativo y otras enfermedades

El fenotipo oxidativo se ha estudiado también en la nefropatía de los Balcanes, en la que se encontró una disminución de los individuos con fenotipo metabolizador lento (Ritchie, 1983) y en el lupus eritematoso sistémico, en el que se encontró un predominio de los metabolizadores lentos (Baer, 1986).

SECCION B:

VALORACION DE FENOTIPO OXIDATIVO

VALORACION IN VIVO

El fenotipo oxidativo de debrisoquina se determina a partir del "índice metabólico" ("metabolic ratio"). Este se obtiene en orina de 8 horas tras administrar 10 mg. de debrisoquina por la siguiente fórmula:

$$\text{Índice metabólico} = \frac{\text{I de debrisoquina no hidroxilada}}{\text{I de debrisoquina hidroxilada}}$$

Las determinaciones de 4-hidroxidebrisoquina y debrisoquina se realizan por cromatografía gaseosa según el método de Lennard y cols., que se describirá en el apartado *Material y Métodos* (Lennard, 1977). El fenotipo metabolizador lento se caracteriza por un índice metabólico mayor de 12.6 (log 10: 1.1).

Este método tiene ciertas limitaciones, ya que el guanoxán, esparteína, fenformina y otros fármacos pueden inhibir la hidroxilación de debrisoquina, y la carbamacepina puede aumentar el índice metabólico (Tablas 6 y 8). Teóricamente cualquier fármaco que siga la misma vía oxidativa que la debrisoquina podría interferir con los resultados de la prueba. La

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

influencia de estos medicamentos puede hacer que se considere metabolizador lento a un metabolizador rápido en el que el metabolismo oxidativo esté inhibido, por lo que se debería suspender su administración antes de realizar la prueba para que ésta sea fiable.

Además, el índice metabólico no refleja solamente los cambios en la biotransformación, sino también diferencias en la excreción, por lo que depende del grado de aclaramiento renal del fármaco. La insuficiencia renal puede alterar la determinación. En un futuro próximo probablemente se podrá determinar el fenotipo oxidativo en sangre por una técnica muy sencilla empleando patrones RLFP (Nebert & González, 1987), lo que obviará la necesidad de administrar un sustrato.

VALORACIÓN IN VITRO

Preparaciones de microsomas hepáticos

La actividad metabólica del citocromo P-450 se puede medir administrando simultáneamente al medio 2 fármacos que se metabolizan por el mismo enzima, que así ejercerán entre sí una inhibición competitiva. Por este método se demostró que la debrisoquina y la esparteína competían por el mismo enzima (Otton, 1982; Boobis, 1983).

Métodos inmunoenzimáticos

Otro método para medir la actividad metabólica "in vitro" es el de competición por anticuerpos, de modo que cada anticuerpo inhibe específicamente su isoenzima cuando se añade a una preparación microsomal. Este método tiene limitaciones derivadas de la necesidad de elaborar anticuerpos específicos para cada isoenzima del citocromo P-450 y de la existencia de reactividad cruzada entre diferentes isoenzimas. Además, es preciso

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

un método para detectar los metabolitos de cada fármaco (Jacqz, 1986).

Ingeniería genética

El gen responsable de la hidroxilación de debrisoquina es un gen estructural, y su ADN complementario ha sido clonado y secuenciado mediante la tecnología habitual de ADN recombinante. Se han identificado en metabolizadores lentos 3 genes mutantes diferentes que dan lugar a 3 secuencias de ARN, incapaces de generar una molécula enzimática funcionante (Gonzalez, 1988).

Tiene la ventaja obvia de evitar los sesgos y errores propios de los estudios metabólicos con grupo control.

MODELOS EXPERIMENTALES

Recientemente se ha identificado un polimorfismo de oxidación de debrisoquina en ratas. Las hembras de las ratas *dark-adapted* metabolizan defectuosamente la debrisoquina (Al Dabbagh, 1981), mientras que las

Sprague-Dawley la metabolizan activamente. Se ha visto que en estas últimas existe un isoenzima de citocromo P-450 (P-450 UT-H) que posee actividad de debrisoquina-hidroxilasa. La unión de anticuerpos anti-P-450 UT-H disminuye en un 90 % la 4-hidroxilación de debrisoquina en esta especie de ratas, lo que sugiere que el citocromo P-450 UT-H desempeña un importante papel en dicha reacción metabólica (Distlerath, 1984). Aunque este citocromo representa el 6 % del P-450 total está prácticamente ausente en microsomas hepáticos de ratas DA (Larrey, 1984). *g*

Se han conseguido también aislar los isoenzimas del citocromo P-450 humano responsables de la hidroxilación de debrisoquina (Kahn, 1982). Anticuerpos dirigidos contra dichos isoenzimas son capaces de inhibir el metabolismo microsomal hepático de ambos fármacos y de otros que se cosegreguen con ellos (Jacqz, 1986).



SECCION 9:

ACETILACION POLIMORFICA

INTRODUCCION

La acetilación es una reacción de conjugación (biotransformación de clase II), mediante la cual el hígado interviene en la detoxificación de ciertas sustancias. Dicha reacción consiste en la incorporación de un radical acetilo, que en realidad es un grupo acetil del acetil-CoA, a los radicales amino o carboxilo de los fármacos. Es catalizado por unos enzimas denominados N-acetil-transferasas (NAT).

Entre las sustancias susceptibles de seguir acetilación se encuentran aquéllas que cuentan con un radical amino ($-NH_2$) en su molécula, especialmente las aminas aromáticas (arilaminas) e hidrazinas (Weber, 1974). Entre ellas destacan la benzidina y el 2-aminofluoreno y aminas endógenas como la serotonina.

La velocidad con que son acetilados ciertos compuestos como el P.A.S. (Jenne, 1965) y el P.A.B.A. (La Du, 1972) es similar en todos los individuos, y para dicho proceso se reserva la denominación de acetilación monomórfica. En cambio, para otras sustancias como la isoniazida, la velocidad de acetilación es variable de unos sujetos a otros,

situación denominada acetilación polimórfica (Evans & White, 1964).

El conocimiento de este fenotipo puede ayudar a determinar el riesgo relativo de toxicidad de algunos fármacos y su respuesta terapéutica.

Distribución según etnias

Evaluaciones cuantitativas de grandes poblaciones demuestran que el fenotipo acetilador presenta una distribución bimodal en 2 grupos bien diferenciados: acetiladores lentos y acetiladores rápidos (Evans & White, 1964).

La distribución del fenotipo acetilador presenta importantes variaciones raciales. La frecuencia del acetiladores rápidos oscila entre el 12% en egipcios y el 95-100 % en esquimales (Clark, 1985), igual que en Japón. En la raza blanca hay un ligero predominio de acetiladores lentos (La Du, 1972; Ellard, 1976), que es algo más marcado en la raza negra (Buchanan, 1976). En el caso concreto de la población española, el 57.3 % de individuos son acetiladores lentos, según los estudios efectuados por el grupo de Ladero (Ladero, 1979). Hay

que destacar que existe cierta variación en la frecuencia del fenotipo acetilador según las regiones españolas. Los porcentajes de fenotipo acetilador rápido en distintas razas están representados en la tabla 12.

Genética del fenotipo acetilador

Estudios familiares demuestran que la acetilación de isoniazida está controlada por un par de alelos autosómicos situados en un único locus de un gen. El carácter acetilador lento parece transmitirse por herencia autosómica recesiva, por lo que todos los individuos que lo poseen son homocigotos, mientras que el carácter acetilador rápido lo hace por herencia autosómica dominante, por lo que existen sujetos homo y heterocigotos (Evans, 1960). En los homocigotos la velocidad de acetilación parece ser más rápida que en los heterocigotos, quedando así lugar para un fenotipo acetilador intermedio (Chapron, 1980; Lee & Lee, 1982).

Sobre el fenotipo acetilador y su importancia clínica se han publicado varias revisiones en los últimos años (Weber & Hein, 1985; Ladero, 1984; Drayer & Reidenberg, 1977; Lunde, 1977; Ladero, 1981; Kalow, 1982; Price Evans, 1984; Clark, 1985; Larrey, 1985; Roots, 1987 y Evans, 1989).

El estudio del fenotipo acetilador tiene mucha importancia por sus implicaciones en los efectos tóxicos de determinados fármacos y como posible marcador genético de diversas enfermedades, que serán comentadas más ampliamente. Igualmente la respuesta terapéutica puede venir condicionada por el fenotipo acetilador.

TABLA 12

**DISTRIBUCION DEL FENOTIPO ACETILADOR
SEGUN EL ORIGEN RACIAL**

A) Origen asiático

Esquimales canadienses	95-100 %
Polinesios de Nueva Zelanda	93 %
Coreanos	89 %
Japoneses	88- 90 %
Ainu	87 %
Ryukyuan	85 %
Lapones finlandeses	80 %
Esquimales de Alaska	79 %
Indios americanos	79 %
Chinos	78- 95 %
Tailandeses	72 %
Filipinos	72 %
Indios canadienses	63 %
Birmanes	62 %
Lapones suecos	50 %
Hindúes	40 %

C) Origen europeo

Latinoamericanos	67 %
Italianos	51 %
Blancos USA	43- 48 %
Noruegos	44 %
Alemanes	43 %
Franceses	41 %
Griegos USA	40 %
Checoslovacos	40 %
Suizos	39 %
Británicos	38- 47 %
Fineses	36- 39 %
Italianos USA	36 %
Escandinavos USA	33 %
Suecos	32- 49 %
Canadienses	30- 41 %
Españoles	43 %

B) Origen africano

Negros sudafricanos	69 %
Negros americanos	49- 58 %
Africanos	43- 51 %
Negros sudaneses	35 %
Negros etiopes	20- 50 %

D) Origen mediterráneo

Judíos Askenazi USA	45 %
Judíos Askenazi Israel	33 %
Israel no Askenazi	31 %
Judíos israelitas de Bagdag	25 %
Egipcios	18 %
Marroquíes	10 %

(modificado de Clark 1.985)

MECANISMOS BIOQUIMICOS: N-Acetiltransferasa

La N-acetilación es mediada por la N-acetiltransferasa (NAT), enzima citosólico de peso molecular 27.000 (Weber, 1974). Este enzima está presente fundamental pero no exclusivamente en el hígado, ya que también se ha detectado en el epitelio de la mucosa del intestino delgado (Jenne, 1965) y en linfocitos. En estos últimos parece existir un polimorfismo acetilador semejante al hepático (McQueen & Weber, 1980). La velocidad de acetilación es unas 8 veces mayor en acetiladores rápidos que en lentos (Glowinski, 1978)

Según Jenne (1965) el déficit de actividad NAT "in vitro" de los acetiladores lentos podría deberse a una disminución cuantitativa del enzima y no a una modificación de su afinidad. Posteriormente se ha señalado que no habría correlación entre la velocidad de acetilación y la dotación cuantitativa del enzima, que parece ser similar en ambos fenotipos (Patterson, 1980). Se sugiere que sería una configuración molecular específica -determinada genéticamente- la que permite procesar algunos sustratos de forma más o menos rápida

rápida y otorgar así el rasgo fenotípico de acetilador rápido o lento (Hein, 1982). Sin embargo, los últimos datos vuelven a señalar que es una carencia de moléculas enzimáticas la responsable de la cualidad de acetilador lento (Grant, 1990)

Variaciones en la actividad enzimática

La NAT polimórfica no es un enzima inducible (Ladero, 1981). Su actividad no parece decrecer significativamente con la edad (Farah, 1977; Ladero & Arrojo, 1983) - si bien Gachály y cols. (Clark, 1985) han observado en algunas poblaciones un número significativamente mayor de acetiladores lentos en mayores de 60 años - ni con el deterioro de la función hepática (Levi, 1968).

La insuficiencia renal sí parece modificar la cinética molecular del sustrato y sus metabolitos (Molin, 1977). La fiabilidad del fenotipo acetilador tiene como límite la cifra de creatinina de 2.5 mg/dL, por encima de la cual la distorsión de los resultados resulta inaceptable (Ladero, datos no publicados). El aclaramiento de sulfadimidina parece aumentar con el

peso corporal (Chapron, 1984), mientras que éste no parece influir en la acetilación de la dapsona (Philip, 1987).

Los glucocorticoides parecen aumentar la actividad del enzima (Sarma, 1980; Du Souich & Courteau, 1981). Para los estrógenos los hallazgos son contradictorios, ya que en la rata la acetilación hepática monomórfica es aumentada bajo su acción (Zidek & Janku, 1979; Schroder, 1979). Sin embargo, en humanos no se han demostrado diferencias del fenotipo acetilador entre ambos sexos. La administración aguda de etanol aumenta la tasa de acetilación de sulfametazina, lo que probablemente se deba al aumento en la oferta de radicales acetil en el citoplasma (Olsen & Morland, 1978).

Para algunos autores este enzima puede verse influido por edad, sexo y factores ambientales (Iselius, 1983; Pralong, 1986)

DETERMINACIÓN DE FENOTIPO ACETILADOR

Existen varios métodos de determinación con numerosas drogas, que están resumidos en la tabla 13. Estos métodos incluyen determinaciones químicas, microbiológicas, fluorométricas y distintos tipos de técnicas cromatográficas. Hasta hace poco tiempo las determinaciones del estado acetilador se han realizado con sulfametacina, ya que es un compuesto estable, relativamente fácil de analizar y el método de determinación es rápido y fiable. En nuestro estudio hemos analizado sulfametazina según la técnica de Bratton & Marshall (Varley, 1962), que será comentada con mayor extensión en el apartado dedicado a material y métodos.

Un método sencillo que posiblemente sea de gran utilidad en el futuro es el desarrollado por Grant y colaboradores (Grant, 1984) con cafeína. Tras administración de cafeína en forma de café, te o cola se recoge orina durante el período comprendido entre la 2ª y la 6ª horas de la misma, y en ella se mide por

cromatografía líquida de alta presión (HPLC) el cociente entre el metabolito AFMU y la 1-metilxantina.

La determinación del *genotipo* acetilador es más compleja, ya que es difícil discriminar si los acetiladores rápidos son homo o heterocigotos. Como ya se comentó previamente en algunos estudios como los de Chapron y cols. (Chapron, 1980) y Lee & Lee (Lee & Lee, 1982) se había sugerido que la velocidad de acetilación parecía ser mayor en acetiladores rápidos homocigotos que en heterocigotos al haber encontrado una frecuencia trimodal de distribución. Por el método de Grant y cols. (Grant, 1984) también se ha observado distribución trimodal en la capacidad de acetilación midiendo los cocientes molares de los metabolitos de cafeína; Este método probablemente sea de utilidad para discriminar los acetiladores rápidos homo y heterocigotos.

TABLA 13

METODOS DE DETERMINACION DE FENOTIPO ACETILADOR

FARMACO	METODO	MEDIDA
Cafeina	HPLC	Cociente AFMU/1-metilxantina en orina de 22-62 h.
Dapsona	Fluorometría HPLC	Cociente acetildapsona/dapsona en plasma a las 4 h. Idem a las 3 h.
Hidralazina	GC y HPLC	Cociente metabolito/hidralazina en orina de 24 h.
Isoniazida	Químicos Fluorometría Microbiológico	Cociente acetyl-INH/INH en orina de 62-82 h, (de 242-252 si se da en preparado retardado) Eliminación por cinética de primer orden en plasma Niveles tuberculostáticos en sangre
Procainamida	TLC GLC HPLC	Cociente acetylPROC/PROC en plasma a las 3 h. " " " " " " " " las 6 h. " " " " " " " " las 24 h.
Sulfamerazina	HPLC	Porcentaje de fármaco acetilado en orina y/o plasma a las 6 h.
Sulfametazina	Químico HPLC	Porcentaje de acetyl-sulfametazina en orina y/o plasma a las 6 h. o medida de eliminación de primer orden por aclaramiento metabólico Porcentaje de acetyl-sulfametazina en plasma de 52-92 h. o aclaramiento renal del metabolito
Sulfadiazina	HPLC	Aclaramiento del N-acetyl-metabolito
Sulfapiridina	HPLC Químico	Aclaramiento del N-acetyl-metabolito Porcentaje de acetyl-sulfapiridina en sangre u orina de 6 h.
Sulfasalazina	Químico HPLC	Porcentaje de acetyl-sulfasalazina en sangre de 6 h. u orina de 62-68 h. Porcentaje de acetyl-sulfasalazina y otros pará- metros farmacocinéticos

AFMU; 5-acetyl-amino-6-formilamino-3-metil-uracilo; HPLC; cromatografía líquida a alta presión; GC; cromatografía gaseosa; TLC; cromatografía en capa fina; GLC; cromatografía gas-líquido;
(Weber & Hein 1.985)

MODELOS ANIMALES

La especie humana no es la única que dispone de acetilación polimórfica. Se ha descrito un modelo en el conejo similar al humano y que es utilizado por las mismas sustancias (Glowinski, 1978; Hein, 1982). Hasta hace poco este animal era el único que se utilizaba para estudios experimentales del polimorfismo acetilador. Se han intentado estudiar otras especies animales como el mono Rhesus, el babuino, el ratón campestre ("deer"), ratón de laboratorio, rata y hámster sirio. Todas estas especies, excepto el babuino, presentan polimorfismo acetilador, aunque los datos para el mono Rhesus y la rata son aún incompletos (Veber & Hein, 1985). El perro carece de capacidad de acetilación hepática (Lower & Bryan, 1973; Miller, 1961; Poirier, 1963). Los modelos con conejo, ratón y hámster han sido muy útiles para conocer datos genéticos, bioquímicos y toxicológicos sobre la N-acetilación.

SECCION 10:

**ACETILACION Y TOXICIDAD Y RESPUESTA
A FARMACOS**

ACETILACION Y TOXICIDAD Y RESPUESTA A FARMACOS

Diversos fármacos sufren acetilación hepática polimórfica, de forma que la posesión de un determinado fenotipo acetilador puede tener trascendencia clínica y/o terapéutica (tabla 14).

Lupus eritematoso inducido por fármacos

El desarrollo de lupus eritematoso sistémico (LES) se ha asociado con el efecto tóxico de algunos medicamentos que se metabolizan por acetilación (tabla 15):

A) La hidralazina, fármaco hipotensor, parece inducir la positivización de anticuerpos antinucleares y el desarrollo de LES con mayor frecuencia y rapidez en acetiladores lentos que en rápidos (Perry, 1970; Perry, 1973; Stollar, 1973; Strandberg, 1976; Batchelor, 1980; Mansilla-Tinoco, 1982), especialmente en sujetos con antígeno HLA-DR. (Batchelor, 1980).

B) La procainamida, fármaco antiarrítmico, induce la positivización de anticuerpos antinucleares y el desarrollo de LES con más frecuencia y precocidad en acetiladores lentos que en rápidos (Henningsen, 1975; Woosley, 1978; Giardina, 1986), aunque Davies y cols. por el contrario han encontrado un predominio significativo de acetiladores rápidos (Davies, 1975).

C) No está aclarado si el LES por isoniazida se asocia con el fenotipo acetilador; según Alarcón-Segovia y cols. es más frecuente en acetiladores lentos (Alarcón-Segovia, 1971; Alarcón-Segovia, 1976), mientras que Evans no ha encontrado diferencias significativas (Evans, 1972).

Hepatitis por isoniazida

La vía principal -pero no la única- de metabolización de isoniazida es la acetilación. La toxicidad de la isoniazida se ha vinculado a un derivado denominado monoacetilhidrazina. La relación del fenotipo acetilador con el desarrollo de hepatitis por isoniazida (INH) ha sido un tema muy debatido. Mitchell

y cols. (Mitchell, 1975; Mitchell, 1976) y otros autores (Estay, 1981) encontraron un predominio de acetiladores rápidos, elaborando la hipótesis de que los acetiladores rápidos formaban monoacetilhidrazina con más rapidez que los acetiladores lentos. Según esta hipótesis patogénica, la monoacetilhidrazina se convertiría a su vez en un metabolito hepatotóxico por hidroxilación en el sistema citocromo P450.

Sin embargo, esta hipótesis fue cuestionada porque los acetiladores rápidos también parecen metabolizar muy rápidamente la monoacetilhidrazina a diacetilhidrazina, que no es hepatotóxica. En esta línea de argumentación los acetiladores lentos serían más susceptibles de sufrir hepatotoxicidad por INH al convertir más lentamente la monoacetilhidrazina a diacetilhidrazina y permitir mayor oferta de monoacetilhidrazina al sistema microsomal para su hidroxilación.

Inicialmente algunos trabajos sugirieron un predominio de acetiladores lentos, pero la valoración de toxicidad hepática es discutible, al considerarse como hepatotoxicidad pequeños aumentos de transaminasas (Bessman, 1953; Beaudry, 1974; Lal, 1972; Smith, 1972; Dickinson, 1977; Gronhagen-Riska, 1976; Dickinson,

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

1981; Musch, 1982). Sin embargo, en grandes series no se han demostrado diferencias significativas (Riska, 1976; Singapore Tuberculosis Service, 1977; Hong-Kong Health Service, 1977; Ellard, 1978; Girling, 1978; Pilheu, 1981; Gurumurthy, 1984).

Otros efectos adversos por fármacos

Se ha sugerido asociación del fenotipo acetilador lento a los siguientes efectos tóxicos de drogas (Weber & Hein, 1985; Clark, 1985):

A) Polineuropatía por isoniazida (se corrige con vitamina B₆).

B) Encefalopatía por isoniazida.

C) Polineuropatías por hidralazina y dapsona.

D) Neurotoxicidad por fenitoína cuando se asocia a INH.

E) Efectos colaterales de sulfasalazina (anemia hemolítica, leucopenia, metahemoglobinemia, náuseas, vómitos, malestar abdominal, cefalea y vértigo).

F) Toxicidad inducida por fenelcina (náuseas, somnolencia).

G) Hemólisis inducida por promizol y dapsona en sujetos con déficit de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.

El síndrome de abstinencia y crisis por privación de clonazepam parecen ser más frecuentes en acetiladores rápidos.

Fenotipo acetilador y respuesta a fármacos

La respuesta terapéutica a algunas drogas parece estar disminuida en acetiladores rápidos con respecto a acetiladores lentos, por lo que es necesario aumentar la dosis de dichos fármacos en aquéllos. Este hecho se ha demostrado para los siguientes:

A) *Isoniasida*: la disminución de respuesta depende también de la combinación farmacológica utilizada en el tratamiento de la tuberculosis (Ellard, 1976).

B) *Procainamida*: el metabolito acetilado parece antagonizar su efecto antiarritmico (Schroder, 1979). Para una misma dosis los acetiladores rápidos tienen un nivel de procainamida más bajo y de N-acetilprocainamida más elevado que los acetiladores lentos. En la práctica los acetiladores lentos requerirían una dosis algo menor que los rápidos.

C) *Hidralazina*: La disponibilidad sistémica varía entre 10-15% en acetiladores rápidos y 30-35% en acetiladores lentos. De hecho, los acetiladores rápidos requieren mayor dosis para el control de la presión arterial (Ramsay, 1984). A destacar, si la hidralazina se asocia a diuréticos o a β -bloqueantes, el fenotipo acetilador no parece influir en la respuesta (Vandenburg, 1982).

Es recomendable no utilizar dosis superiores a las necesarias en sujetos con fenotipo acetilador lento, porque aumentan la posibilidad de desarrollar síndrome lupoide.

D) *Dapsona*: se precisa mayor dosis en acetiladores rápidos para el tratamiento de la dermatitis herpetiforme (Holmekoski, 1978).

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

E) *Fenelcina*: parece precisarse mayor dosis en acetiladores rápidos por ser en éstos menor la respuesta antidepressiva, pero este hecho no está claramente demostrado (Clark, 1985).

F) *Ti~~mo~~xamina*: los acetiladores lentos parecen tener peor respuesta que los rápidos a este fármaco usado en el tratamiento de la enfermedad de Ménière (Young, 1980).

TABLA 14

SUSTANCIAS SOMETIDAS A ACETILACION HEPATICA POLIMORFICA

- A) Drogas arilaminicas y metabolitos hidrazinicos**
 - Procainamida
 - Dapsona
 - Aminoglutetimida
- B) Drogas hidrazinicas**
 - Isoniazida (INH)
 - Monoacetilhidrazina (MAH)
 - Hidralazina
 - Fenelcina
- C) Arilaminas secundarias y metabolitos hidrazinicos**
 - Sulfasalazina (salicilazosulfapiridina)
 - Sulfametazina
 - Nitrazepam y clonazepam (tras nitrorreducción)
 - Acetobutolol
 - Cafeína
- D) Mutágenos arilaminas y carcinógenos**
 - Benzidina
 - Alfa y beta-naftilaminas
 - 4-aminobifenil
 - Metilen-bis-cloro-amina (MOCA)
 - 2-aminofluorano
- E) Timoxamina**

(tomado de Veber & Hein 1.985 y Ladero 1.984)

TABLA 15

**FENOTIPO ACETILADOR:
TOXICIDAD FARMACOLÓGICA Y ENFERMEDADES RELACIONADAS**

A) Acetiladores lentos.

1. Formación precoz de anticuerpos antinucleares durante tratamiento con procainamida.
2. LES más precoz y frecuente tras exposición a procainamida, hidralazina o isoniazidas.
3. Mayor frecuencia de cianosis, hemólisis y reticulocitosis por salazosulfapiridina.
4. Mayor frecuencia de polineuropatía por isoniazida.
5. Mayor frecuencia de efectos colaterales al asociar isoniazida y fenitoína.
6. Mayor riesgo de hemólisis por dapsona en caso de déficit de glucosa-6-P-deshidrogenasa.
7. Mayor riesgo de cáncer de vejiga y de estómago.

B) Acetiladores rápidos

1. Mayor frecuencia de hepatitis por isoniazida (dudoso).
2. Mayor frecuencia de fallo terapéutico por isoniazida.
3. Mayor riesgo de diabetes insulina-dependiente.
4. Mayor riesgo de cáncer de mama y leucemia (dudoso).

(Roots y cols. 1.987)

SECCION 11:

FENOTIPO ACETILADOR Y ENFERMEDAD

Cáncer de vejiga

Sin lugar a dudas, el cáncer de vejiga es la neoplasia más estrechamente estudiada a propósito de la eventual influencia que el fenotipo acetilador podría tener en la carcinogénesis. Se han realizado varios estudios acerca del fenotipo acetilador en pacientes con cáncer de vejiga. Algunos de estos estudios muestran un ligero predominio de acetiladores lentos (tabla 16). La suma de resultados conocidos hasta la fecha muestra un predominio de acetiladores lentos que alcanza significación estadística. Este procedimiento (metaanálisis) es, sin embargo, delicado, exige una metodología muy rigurosa y las conclusiones obtenidas deben ser valoradas cuidadosamente.

También se ha sugerido un predominio del fenotipo acetilador lento en estadios más avanzados (Cartwright, 1982; Mommsen, 1982) y en el carcinoma "in situ" (Cartwright, 1982), aunque también en esta cuestión se mantienen las discrepancias (Ladero, 1985).

En el subgrupo de pacientes con cáncer de vejiga atribuible a exposición industrial (laboral), la situación podría ser algo distinta. Hay un predominio

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

de acetiladores lentos en sujetos expuestos industrialmente a arilaminas carcinógenas en comparación con controles sanos (Cartwright, 1982; Ladero, 1985). Este hecho no ha sido confirmado en otra serie (Miller & Cossgriff, 1983), si bien el número de casos en ésta última es muy reducido.

Datos experimentales

Estudios experimentales en perros realizados por Poirier y cols. (Poirier, 1963) demostraron que estos animales desarrollaban cáncer hepático y cáncer vesical tras la administración de arilaminas acetiladas. Significativamente, sólo se producía cáncer vesical si se administraba arilaminas no acetiladas. Dado que el perro carece de actividad acetiladora, los resultados de dichos estudios sugieren que la acetilación no interviene en la carcinogénesis vesical, al menos en esta especie.

Es posible, pues, que la carcinogénesis vesical esté en relación con procesos de hidroxilación y posterior glucuronización de arilaminas en hígado, produciéndose

TABLA 16
ESTUDIOS SOBRE FENOTIPO ACETILADOR
EN CANCER DE VEJIGA

	PACIENTES		CONTROLES		χ^2	P
	Lentos	Rápidos	Lentos	Rápidos		
Lower 1,979 y Wolf 1,980	46	25	38	36	2,68	n.s.
Lower 1973	80	35	79	39	0,18	n.s.
Carterwright 1,982	74	37	118	89	2,82	n.s.
Moassen 1,982	114	66	24	22	1,92	n.s.
Woodhouse 1,983	21	9	16	13	1,39	n.s.
Miller & Cosgriff 1,983	12	14	18	8	2,84	n.s.
Weber 1,983	13	5	11	8	0,83	n.s.
Evans 1,983	66	34	510	342	1,41	n.s.
Ladero 1,985	83	47	90	67	0,97	n.s.
TOTAL	509	272	904	624	7,26	< 0,01

posteriormente la hidrólisis del compuesto conjugado con ácido glucurónico a nivel de vejiga, y liberándose así el carcinógeno activo (Lower, 1982).

La acetilación parece representar una reacción metabólica "defensiva", en la medida en que la actividad (rapidez) disminuirá el número de moléculas de arilaminas disponibles para metabolizarse por la vía previamente mencionada, y por tanto los acetiladores rápidos tendrían teóricamente menor riesgo de padecer cáncer vesical. Esta reacción de acetilación sería un mecanismo defensivo frente a xenobióticos diversos, presente precozmente en la filogenia.

Otras neoplasias

En cáncer de mama se ha encontrado (Bulovskaya, 1978) un aumento significativo de acetiladores rápidos (68/32%). Este hecho fue interpretado como un aumento de la velocidad de acetilación inducido por las células neoplásicas, de forma que en general las pacientes presentaban un aumento de la capacidad acetiladora. Se apuntó como hipótesis que en el proceso de oncogénesis podrían verse involucrados cambios en la actividad de

N-acetiltransferasa y en el fenotipo acetilador. Una valoración crítica permite observar diversas deficiencias: estudio tanto en enfermedad precoz como en enfermedad avanzada (en pacientes con posible hipoalbuminemia) y tratamiento quimioterápico previo a una fracción grande de pacientes.

Otros estudios más recientes (Ladero, 1987; Philip, 1987) no demostraron predominio significativo de ningún fenotipo acetilador.

También en estudios recientes se ha descrito un predominio del fenotipo acetilador lento en cáncer gástrico (Roots, 1987). No se han descrito diferencias significativas en linfomas (Philip, 1987 Cancer Chemoter. Pharmacol.)

En cáncer de colon se ha sugerido que la actividad acetiltransferasa puede jugar un papel en la carcinogenesis intestinal inducida por aminas aromáticas (Lang, 1986; Ilet, 1986). La mucosa colónica presenta niveles altos de N-acetiltransferasa, enzima capaz de catalizar la O-acetilación de metabolitos N-hidroxi, que se convierten a su vez en derivados reactivos con el DNA. Se piensa que

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

determinados productos de la pirolisis de los alimentos como aminas aromáticas heterocíclicas tienen una capacidad mutagénica muy importante y pueden ocasionar en animales de experimentación tumores intestinales (Takayama, 1984). Se ha encontrado en heces humanas mutágenos en mayor proporción en pacientes con riesgo aumentado de cáncer de colon (Ehrich, 1979;

En el estudio de Lang (1986) se encontró una proporción significativamente mayor de acetiladores rápidos.

Ambos estudios, sin embargo, presentan series cortas de pacientes. Es necesario confirmar estos hallazgos preliminares sobre grupos más amplios.

SECCION 12:

**FENOTIPO ACETILADOR Y
PROCESOS NO TUMORALES**

Lupus eritematoso sistémico (LES) idiopático

Ha habido gran controversia en la literatura sobre la posible relación entre fenotipo acetilador y LES idiopático. El primer estudio en relación con este tema fue publicado por Godeau y cols. (Godeau, 1973), que encontraron una mayor tasa de INH libre en el suero de pacientes con LES que en controles a las 6 horas de la administración de dicho fármaco, sugiriendo que los acetiladores lentos eran más susceptibles de padecer LES.

En algunos estudios posteriores se ha encontrado un predominio significativo del fenotipo acetilador lento (Reidenberg, 1974; Johansson, 1976; Fishbein & Alarcón-Segovia, 1976; Larsson, 1977; Foad, 1977; Fishbein & Alarcón-Segovia, 1979; Reidenberg, 1980). Se ha sugerido que colorantes básicos presentes en la dieta y en productos para el cabello podrían ser la causa del LES idiopático tras transformación en compuestos aromáticos aminados en intestino por una reacción de nitrorreducción mediada por las bacterias intestinales, siendo mayor la persistencia de estas sustancias en acetiladores lentos (Reidenberg, 1974).

Sin embargo, en otros estudios no se ha confirmado predominio de ningún fenotipo acetilador (Vansant, 1978; Morris, 1979; Lawson, 1979; Ishikazi, 1981; Horai, 1982). Reidenberg publicó en, 1980 una revisión de la literatura conocida hasta la fecha, encontrando 150 acetiladores lentos y 77 acetiladores rápidos, lo que suponía un predominio significativo del fenotipo acetilador lento. Una revisión reciente (Ladero, 1988) parece descartar por completo esta relación.

Tampoco el polimorfismo acetilador parece representar ningún riesgo para el desarrollo de lupus eritematoso discoide cutáneo (Ladero, 1988)

Diabetes mellitus

Los primeros estudios sobre fenotipo acetilador en la diabetes no insulín-dependiente fueron realizados por Burrows y cols (Burrows, 1978) encontrando un 62 % de acetiladores rápidos (29 de 47), lo que representaba un predominio no significativo de acetiladores rápidos con respecto a controles. También observaron que la edad de

comienzo era significativamente mayor en acetiladores rápidos que en lentos. Este predominio de acetiladores rápidos no ha sido confirmado en estudios posteriores (Ladero, 1982; Shenfield, 1982). Sin embargo, en un estudio se encontró predominio de acetiladores rápidos en individuos con diabetes mal controlada con respecto a controles (Shenfield, 1982). Estos datos permiten concluir que el fenotipo acetilador no es un buen marcador genético de la diabetes no insulín-dependiente.

En la *diabetes insulín-dependiente* los primeros estudios fueron realizados por Mattila & Tiitinen (Mattila & Tiitinen, 1967), que demostraron un predominio de acetiladores rápidos (7 de 9), y sugirieron que la velocidad de acetilación podría estar acelerada en la diabetes severa (tabla 15); de hecho se ha demostrado que la tasa de acetilación de sulfametazina es mayor en diabéticos que en controles (Shenfield, 1982).

Varios estudios posteriores no han confirmado este predominio del fenotipo acetilador rápido (McLaren, 1977; Bodansky, 1981; Ladero, 1982; Shenfield, 1982). El metanálisis, sin embargo, sugiere un predominio

significativo de dicho fenotipo (Ladero, 1984). Por tanto, aunque con reservas, el fenotipo acetilador rápido podría ser un marcador genético de diabetes insulín-dependiente, al menos en grupos étnicos de origen europeo, ya que Evans y cols. han detectado un predominio de acetiladores lentos en diabéticos saudíes (Evans 1985).

En cuanto a las *complicaciones de la diabetes mellitus*, estudios de McLaren y cols. (McLaren, 1977) demostraron menor frecuencia de desarrollo de polineuropatía en acetiladores rápidos, sugiriendo que este fenotipo protegería del desarrollo de la citada complicación; sin embargo, otros autores han descartado esta posibilidad (Bodansky, 1982; Ladero, 1983). Tampoco se ha encontrado relación del fenotipo acetilador con el desarrollo de retinopatía diabética (Bodansky, 1981; Ladero, 1982).

Otras enfermedades

En la *enfermedad de Gilbert* se ha demostrado un predominio significativo de acetiladores lentos

(Platzer, 1982). En enfermedad de Basedow no se han encontrado diferencias significativas, aunque se ha señalado que la edad de comienzo de dicha enfermedad es más precoz en acetiladores lentos (Ladero, 1983). En artritis reumatoide asociada a síndrome de Sjögren parece haber un predominio de acetiladores lentos (Ledden, 1981).

Finalmente, en la lepra una serie china (población en la que hay predominio de acetiladores rápidos) demostró un predominio de acetiladores lentos, hallazgo no confirmado en otras series.

En la tabla 17 se exponen otras enfermedades en las que se ha estudiado el fenotipo acetilador y en las que no se ha demostrado ninguna relación con el fenotipo acetilador (Evans, 1984)

TABLA 17

**ENFERMEDADES SIN RELACION DEMOSTRADA
CON FENOTIPO ACETILADOR**

A) Enfermedades psiquiátricas.

Esquizofrenia
Depresión neurótica
Depresión endógena
Neurosis de ansiedad
Estados fóbico-ansiosos

B) Enfermedades gastrointestinales.

Úlcera duodenal
Colitis ulcerosa
Enfermedad de Crohn
Síndrome postgastrectomía

C) Enfermedades cardiovasculares.

Hipertensión arterial
Infarto miocárdico

D) Miscelánea

Dermatitis herpetiforme
Insuficiencia renal
Artritis reumatoide
Porfiria cutánea tarda
Síndrome tóxico por aceite
de colza
Anemia de células falciformes
Mongolismo

PARTE II

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

OBJETIVOS

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

En esta Tesis Doctoral pretendemos:

1) Estudiar si el polimorfismo oxidativo de debrisoquina puede constituir un marcador de susceptibilidad genética para el padecimiento de cáncer de pulmón.

2) Cuantificar la posible influencia que la capacidad oxidativa de debrisoquina puede ejercer sobre el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón.

3) Estudiar si el polimorfismo acetilador puede constituir un marcador de susceptibilidad genética para el padecimiento de cáncer de pulmón.

4) Cuantificar la influencia que el fenotipo acetilador puede ejercer en la carcinogénesis pulmonar.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

5) Analizar por separado la relación entre los distintos tipos histológicos, especialmente los relacionados epidemiológicamente con el consumo de tabaco, con los polimorfismos enzimáticos estudiados (acetilador de sulfametacina y oxidativo de debrisoquina) en pacientes con cáncer de pulmón.

PACIENTES Y METODOS

PACIENTES

Se han incluido en el estudio 100 pacientes afectados de carcinoma de pulmón de diversos Centros: Hospital General Gregorio Marañón de Madrid, Hospital Clínico Universitario San Carlos de Madrid y Hospital Clínico Universitario de Zaragoza.

Se realizó una encuesta a todos los pacientes que incluía información acerca de consumo de tabaco (cantidad y tiempo de consumo), medicación en curso y posibles riesgos laborales.

El grupo control utilizado para determinación de fenotipo oxidativo estaba constituido por 143 varones sanos, fumadores, que no habían recibido medicación en las 2 semanas precedentes. El grupo control utilizado para determinación de fenotipo acetilador estaba constituido por 93 individuos sanos, de los que 41 eran varones, no afectas de procesos relacionados con el polimorfismo acetilador.

De los 100 pacientes incluidos, en 71 pacientes fue posible la determinación de ambos fenotipos: fenotipo oxidativo de debrisoquina y fenotipo acetilador. En 16

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

pacientes se realizó solo la determinación de fenotipo acetilador al estar en tratamiento con sustancias que interfieren con la actividad de la izozima P-450 db 1. En 13 casos se realizó exclusivamente la determinación del fenotipo oxidativo. Por tanto, el fenotipo oxidativo fue determinado en 84 casos mientras que el fenotipo acetilador fue determinado en 87 pacientes.

Condiciones de inclusión

- Diagnóstico histológico de cáncer de pulmón
- No tratamiento específico previo (incluyendo cirugía, radioterapia o quimioterapia)
- Consentimiento de participación en el estudio
- Estado general aceptable con Performance status según escala de Karnofsky superior a 60
- Función hepática conservada (no metástasis hepáticas)
- Función renal conservada

(tabla 18)

POLIMORFISMO OXIDATIVO DE DEBRISOQUINA

Metodología de la recogida de muestra

Se administró a cada paciente 1 comprimido de sulfato de debrisoquina equivalente a 10 mg. de debrisoquina (Declinax; Roche), recogiénose la orina de las 8 horas siguientes a la hora de la toma.

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

Todos los pacientes tenían funciones hepática, renal y cardíaca normales, tal y como se ha mencionado (Tabla 11). Previamente al estudio se suspendieron los tratamientos con fármacos potencialmente inhibidores de la hidroxilación de debrisoquina como anticolinérgicos, neurolepticos, antidepresivos tricíclicos, β -bloqueantes, etc.

DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO OXIDATIVO

Descripción de la técnica

El fenotipo oxidativo se determinó por una técnica de extracción por éter para cromatografía de gases con detector de ionización de llama de hidrógeno siguiendo la técnica de Lennard y cols. (1977) con algunas modificaciones (Cobaleda, 1989). Todas las muestras se analizaron por duplicado, utilizándose reactivos de Laboratorios Merck.

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

En una primera fase se toma 1 mL de orina y se pone en 1 tubo de vidrio de 15 mL con tapón de rosca y cubretapa interna de teflón. Sucesivamente se añaden:

A) 0.5 mL de una solución de HCO_3Na saturado.

B) Metanol 0.5 mL.

C) 75 μL de guanoxán (Pfizer), que se añade con microjeringa de vidrio de 100 μL (es muy importante la exactitud de esta medida, ya que es el estándar interno).

D) 0.5 mL de acetilacetona (Merck 800023).

La mezcla así obtenida se agita con un vórtex durante 15 segundos, y se introduce en un baño de agua con agitación a 50 °C durante 16 horas. En esta fase se preparan las muestras para que durante el tiempo de incubación la acetilacetona reaccione con un radical que poseen la debrisoquina, la 4-hidroxidebrisoquina y el guanoxán para formar un derivado pirimidínico.

cual es soluble en solventes orgánicos y puede detectarse por cromatografía de gases.

Tras dicho período de incubación los mencionados compuestos deben ser extraídos para separarlos de los residuos orgánicos, para lo cual se hace lo siguiente:

A) Añadir 6 mL de dietiléter (Merck 921) con dosificador o pipeta de vidrio.

B) Agitar enérgicamente durante 5 minutos con agitador de volteo marca Heidolph modelo Reax 2 con velocidad de giro de 60 rpm durante 8 minutos.

C) Extraer la fase superior (la de éter), con pipetas de vidrio tipo Pasteur y ponerla en tubos cónicos de 12 µL con tapón de vidrio.

D) Añadir 0.3 mL de ClH 4 M y agitar durante 15 segundos en vórtex.

E) Separar la fase inferior acuosa, en la cual se disuelven los compuestos formados, y ponerla en nuevos

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

tubos de vidrio de 6 mL con tapón de vidrio usando una pipeta Pasteur de vidrio.

F) Eliminar los posibles restos de éter que puedan haber sido trasvasados con la muestra anterior, lo que se realiza colocando las muestras en un baño de agua a 56°C durante 10-15 minutos.

G) Añadir 0.4 mL de una solución de NaOH 4 M; cantidad suficiente para neutralizar la acidez del ClH.

H) Añadir con microjeringa de vidrio 40 µL de S₂C (Merck 2210).

I) Agitar los tubos durante 15 segundos en vórtex (debe hacerse lo más precozmente posible dada la gran volatilidad del S₂C).

J) Centrifugar a 1.500-2.000 rpm durante 5 minutos para que la gota de S₂C, que contiene disueltos los compuestos pirimidínicos formados por la debrisoquina, 4-hidroxidebrisoquina y guanoxán, se deposite en el vértice del tubo cónico.

K) Recoger 2 μL de la muestra con una microjeringa de vidrio de 5 ó 10 μL e inyectarlos en el cromatógrafo de gases.

Finalmente se obtienen unos cromatogramas en los que se identifican 3 picos, que en la técnica de Lennard y cols. aparecen tras un tiempo de retención de 1.2 minutos para la debrisoquina; 2.8 minutos para el guanoxán y 3.2 minutos para la 4-hidroxidebrisoquina. El pico de la debrisoquina es el que se identifica con más dificultad, pues pueden formarse derivados de la 3,4-dihidro-1-metil-2CH-isoquino-lincarboxamida que tienen un tiempo de retención similar.

Hay que tener en cuenta que el tamaño de los picos depende de muchos factores como la temperatura del aparato, el grado de pureza de los gases y reactivos y sobre todo de la atenuación eléctrica del aparato (que en ocasiones hay que modificar) y de la calidad de la inyección. Para evitar dichos factores y conseguir una homogeneidad y reproductibilidad de los resultados se utiliza el estándar interno (guanoxán), que tiene una estructura química similar a la de los compuestos a

detectar, y que como ya se comentó se añade al comienzo de la técnica.

Descripción de los aparatos

El cromatógrafo de gases es un aparato marca Varian de la serie 2440 dotado de inyector, columna de vidrio de 2 m. de longitud y 3 mm. de diámetro con un 3 % de OV225 sobre una base de Chromosob WHP 100/120 y un detector de ionización de llama de hidrógeno.

Los gases utilizados son hidrógeno de calidad para producir la llama del detector, aire sintético como soporte a la combustión del hidrógeno y nitrógeno de calidad N-48 como transportador.

Las condiciones de funcionamiento son una temperatura de 250 °C en el inyector, columna y detector y unos flujos de gases de 60 mL/min. para el hidrógeno, 240 mL/min. para el aire sintético puro y 50 mL/min. para el nitrógeno.

El cromatógrafo está conectado a un registrador marca Varian Aerograph modelo A-25 de la serie 9245. La velocidad de avance del papel es de 1 cm/min.

Cálculo del índice metabólico

Una vez obtenidos los picos en el cromatograma se comparan con el cromatograma de una orina "blanco" (de individuo que no haya ingerido ningún fármaco, café, alcohol y que no contenga ninguna de las sustancias que nos interesa determinar) y con el cromatograma de la orina del mismo individuo a la que se han añadido cantidades conocidas de las 3 sustancias a determinar (debrisoquina, 4-hidroxidebrisoquina y guanoxán), y se determinan sus tiempos de retención.

Se procede a la medición de la altura de los picos, representada por la longitud de la bisectriz de éstos desde el vértice del ángulo hasta el punto donde dicha bisectriz corta a la línea de base. La longitud de la

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

bisectriz del pico del guanoxán será el denominador de dos cocientes que tienen como numeradores las longitudes de los picos de debrisoquina y 4-hidroxidebrisoquina. Estas medidas de longitud se transforman en unidades de concentración utilizando una curva patrón (en $\mu\text{M/mL}$). Puesto que un comprimido de sulfato de debrisoquina tiene 10 mg de debrisoquina, equivalentes a 57.1 μM de dicho compuesto, el porcentaje eliminado se obtiene por una regla de tres, aplicando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ eliminado} = \frac{100 \times \text{diuresis} \times \left(\frac{1}{1,000} \right) \text{ diuresis} \times ()}{57.1 \quad 571}$$

Finalmente, relacionando el porcentaje de 4-hidroxidebrisoquina con el de debrisoquina obtendremos el índice metabólico. Como ya ha sido referido, se consideran oxidadores lentos de debrisoquina a los individuos cuyo índice metabólico es mayor de 12.6, siendo oxidadores rápidos los que no superan dicho límite (Price-Evans., 1980).

TABLA 18

CRITERIOS DE EXCLUSION DE PACIENTES

-
- a. Insuficiencia renal
 - b. Insuficiencia hepática o metástasis hepáticas
 - c. Tratamiento con drogas que pueden interferir con debrisoquina
 - d. Arterioesclerosis severa (angor pectoris, ACVA previo)
 - e. Hipotensión ortostática
 - f. Supervivencia esperada menor de 3 meses
-

DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO ACETILADOR

Método de recogida de la muestra

Se administra una dosis aproximada de sulfametazina de 10 mg/kg (peso < 53 kg \Rightarrow 500 mg; peso 53-81 kg \Rightarrow 750 mg; peso > 81 kg \Rightarrow 1000 mg).

Se permite desayunar al cabo de 2 horas, se extrae sangre a las 6 horas utilizando heparina como anticoagulante para separar el plasma. Las muestras pueden conservarse a - 20 °C durante períodos largos de tiempo.

Método de determinación

El fenotipo acetilador se determinó a partir de la tasa o porcentaje de acetilación de sulfametacina, para lo cual se midieron sulfametacina libre y sulfametacina conjugada en plasma según el método de Bratton & Marshall (Varley, 1962).

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Las determinaciones se llevaron a cabo con un espectrofotómetro Hitachi 180 de alta sensibilidad. Se consideran acetiladores lentos a los sujetos que tienen menos del 45 % de la sulfametacina plasmática en su forma acetilada o conjugada. Son acetiladores rápidos aquéllos que superan el citado límite (Viznerova, 1973).

Dicha determinación se realiza en 2 fases:

A) Fase 1.

1. Sulfametacina libre en plasma.

-En tubo de centrifuga poner 2 mL de agua desionizada, 1 mL de ácido tricloroacético al 20 % y 1 mL de plasma.

-Centrifugar y separar el sobrenadante.

-Tomar 1 mL del sobrenadante y añadir 1 mL de tricloroacético al 5 %; reservar los 2 mL resultantes.

2. Sulfametacina total en plasma.

-Se toma 1 mL del sobrenadante obtenido por centrifugación y se añade 1 mL de ClH 2 M.

-Se calienta a 100 °C al baño maría durante 1 hora en un tubo graduado.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

-Se añade el volumen de agua perdida por evaporación hasta completar los 2 mL originales.

B) Fase 2.

Común para los 2 tubos obtenidos durante la fase 1, para un blanco de tricloroacético al 5 % y para un patrón o estándar de 2 mL de solución de sulfametacina en tricloroacético al 5 % de 5 µg/mL de concentración:

1. Añadir 0.2 mL de nitrito sódico al 0.1 % y agitar fuertemente.
2. A los 3 minutos añadir 0.2 mL de sulfamato amónico al 0.5 % y agitar enérgicamente.
3. Al cabo de otros 2 minutos añadir 1 ml de solución de N-1-naftil-etilén-diamina hidrocioruro al 0.05 %. Agitar.
4. A los 10 minutos proceder a la lectura espectrofotométrica con una longitud de onda de 548 mµ. El estándar debe dar una lectura de 0.5 en absorción (densidad óptica).

La sulfametacina conjugada se averigua restando la libre de la total. Finalmente se establece el porcentaje de sulfametacina conjugada con respecto a la

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

total, con lo que habremos determinado el fenotipo acetilador.

VALORACION ESTADISTICA

Métodos descriptivos (Carrasco, 1986; Swincow, 1976)

A) Medidas de centralización: media aritmética

Las medidas de centralización sirven para averiguar alrededor de qué valores se agrupan los datos de una distribución. La más importante es la media aritmética (m), que se calcula por la siguiente fórmula:

$$m = \frac{\sum f_i \cdot x_i}{n}$$

B) Medidas de dispersión: desviación estándar

Las medidas de dispersión sirven para averiguar en qué grado los valores de una distribución se concentran alrededor de la media aritmética. La más importante es

la desviación estándar (σ), que se calcula por la siguiente fórmula:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n}}$$

Métodos de comparación entre dos muestras

A) *Test de Kolmogorov-Smirnov*

Permite comprobar la bondad de un ajuste de distribuciones. Se comparan la distribución experimental acumulativa (casos) y la distribución teórica acumulativa (controles). Se determina el punto en que ambas muestran mayor divergencia y se calcula en las correspondientes tablas si la probabilidad de tal diferencia no está justificada por el azar.

C) t de student

Permite averiguar si la diferencia entre las medias de 2 distribuciones es o no significativa. Se averigua por la siguiente fórmula:

$$t = \frac{m_x - m_y}{DS^2 (1/n_x + 1/n_y)}$$

$$DS^2 = \frac{\sum (x_i - m_x)^2 + \sum (y_i - m_y)^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}$$

Con el valor obtenido se va a la tabla correspondiente.

Comparación de variables cualitativas

A) χ^2 (chi-cuadrado)

Sirve para valorar la homogeneidad de un conjunto de muestras tratando de averiguar si se puede suponer que proceden de una población común o si por el contrario su diferente comportamiento resulta estadísticamente significativo, en cuyo caso no serían homogéneas. Se calcula por la siguiente expresión, siendo E el valor experimental y T el valor teórico:

$$\chi^2 = \sum \frac{(E - T)^2}{T}$$

Cuando la tabla es de 2 filas y 2 columnas (2 x 2) y el total no llega a 200 individuos se ha propuesto la corrección de Yates, que se obtiene por la fórmula siguiente:

$$\chi^2 = \sum \frac{(E - T - 0.5)^2}{T}$$

Correlación de variables cuantitativas

Se denomina correlación a la prueba estadística que investiga la relación entre 2 variables cuantitativas. El coeficiente de correlación (r) se averigua por la siguiente ecuación:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x}) (y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

El coeficiente de correlación r es estadísticamente significativo si se cumple la expresión siguiente:

$$|r| > t_{\alpha/2, n-2} \sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}$$

El valor de t será el de la tabla de la t de student para los grados de libertad correspondientes.

Distribución de Poisson

Como sabemos, la ley binomial es una ley teórica de aplicación siempre que se conozca, de entrada, la probabilidad de aparición de un fenómeno biológico. La distribución de Poisson constituye un caso particular de la ley binomial para aquellas situaciones en que la probabilidad de aparición de un suceso sea muy pequeña. Es, por tanto, la ley adecuada para sucesos raros, de aquellos sucesos discretos extendidos en intervalos grandes o en intervalos continuos (tiempo, áreas, volúmenes). En definitiva, para aquellos casos en que la probabilidad de que ocurra una vez el suceso en un intervalo suficientemente pequeño sea proporcional a la longitud del intervalo.

La fórmula de Poisson queda como sigue:

$$y = \frac{m^x}{x!} e^{-m}$$

Cuanto más raro sea el fenómeno y mayor el colectivo y mayor sea el colectivo, más exacta será la aplicación de la ley de Poisson.

RESULTADOS

FENOTIPO OXIDATIVO

De los 84 pacientes en que se determinó el fenotipo oxidativo, 3 eran mujeres. La edad media del grupo fue 61'6 años (desviación típica: 8'7). Ningún paciente tomaba medicamentos capaces de interferir con la actividad del isoenzima P-450 db1. Excepto 2, todos los pacientes eran o habían sido fumadores.

4 pacientes (4'8%) pertenecientes al grupo de cáncer de pulmón fueron clasificados como oxidadores lentos de debrisoquina. La edad media del grupo control fue de 27'9 años (desviación típica: 10'6). En el grupo control se encontraron 10 pacientes oxidadores lentos (7%). La diferencia no alcanza significación estadística.

Por *grupos histológicos* (tabla 19), se encontraron 45 casos de histología epidermoide, 28 casos de histología

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

microcítico; 10 casos de adenocarcinoma, 1 caso de carcinoma de células grandes. La distribución del fenotipo oxidativo lento por subgrupos histológicos es como sigue: total 4 casos; epidermoide 1 caso; microcítico 0 casos; adenocarcinoma 2 casos; células grandes 1 caso.

Por tanto, en los subtipos *epidermoide* y *microcítico*, vinculados de forma primordial con el consumo de tabaco se han encontrado solo 1 caso de fenotipo oxidativo. La comparación de esta distribución con el grupo control difiere significativamente ($p = 0.031$), de forma que hay un predominio de pacientes con fenotipo oxidativo rápido.

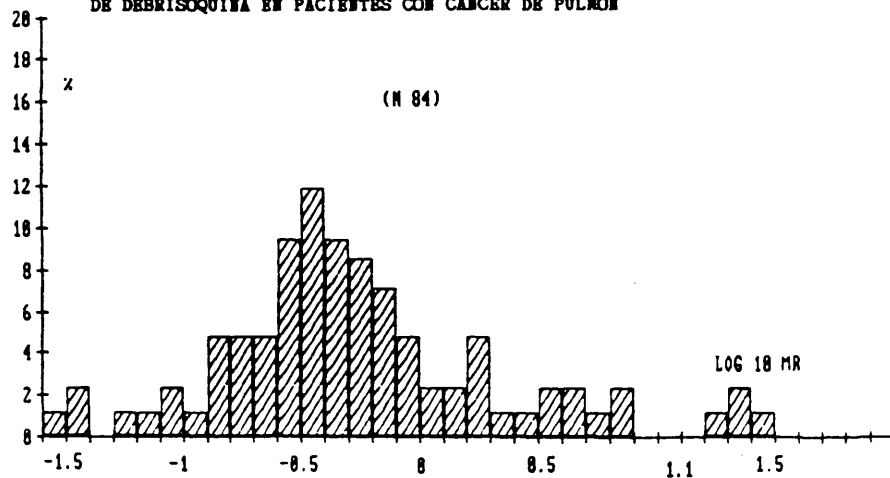
La comparación de la distribución de frecuencias entre el grupo de pacientes y el grupo control para los valores del logaritmo 10 de la tasa metabólica (test de Kolmogorov-Smirnov) no muestra diferencias significativas (Figura 1).

TABLA 19

DISTRIBUCION DE FENOTIPO OXIDATIVO Y TIPO HISTOLOGICO

TIPO HISTOLOGICO	NR CASOS	METABOL RAPIDOS	METABOL LENTOS
Epidermoide	45	44	1
Microcítico	28	28	0
Adenocarcinoma	10	8	2
Células grandes	1	0	1
Total	84	80	4

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE VALORES DEL LOG 10 DEL COCIENTE METABOLICO
DE DEBRISOQUINA EN PACIENTES CON CANCER DE PULMON



DISTRIBUCION PORCENTUAL DE VALORES DEL LOG 10 DEL COCIENTE METABOLICO
DE DEBRISOQUINA EN CONTROLES

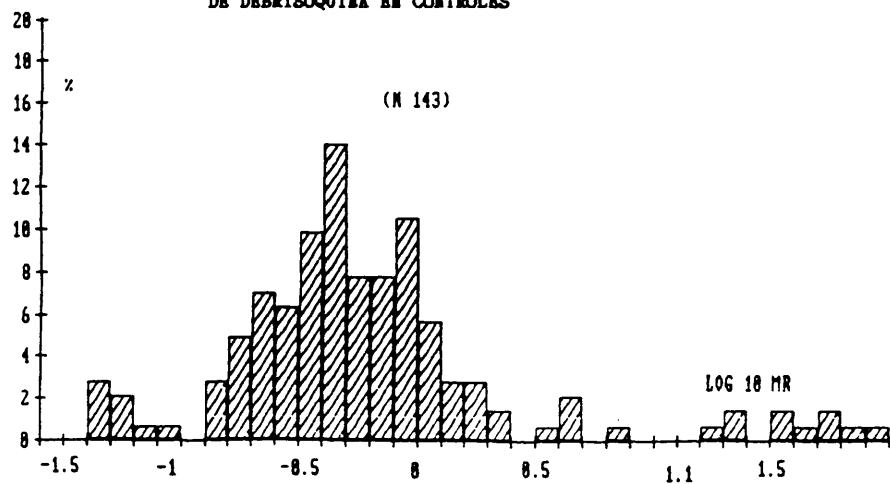


Figura 1

FENOTIPO ACETILADOR

Para la determinación del fenotipo acetilador se han incluido 87 pacientes, de los que 3 eran mujeres. La edad media era de 61'6 años (desviación típica: 8'85). Ningún paciente recibía fármacos capaces de interferir con la técnica de determinación de acetilación polimórfica.

La edad media en el grupo control fue de 63'5 años (desviación típica: 8'3). 54 sujetos fueron clasificados como acetiladores lentos y 39 como acetiladores rápidos.

48 pacientes pertenecientes al grupo de cáncer de pulmón fueron clasificados como acetiladores lentos. En el grupo control se encontraron 54 casos. La diferencia no alcanza significación estadística. En la figura 2 se muestra la distribución de frecuencias de las diferentes tasas de acetilación en casos y controles.

Por *grupos histológicos* (tabla 20), se encontraron 48 casos de histología epidermoide, 27 casos de histología

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

microcítico; 11 casos de adenocarcinoma, 1 caso de adenocarcinoma de células grandes. La distribución de fenotipo acetilador lento por subgrupos histológicos es como sigue: total 48 casos; epidermoide 27 casos (56.2%); microcítico 16 (59.2%) casos; adenocarcinoma 4 (36.4%) casos; células grandes 1 caso.

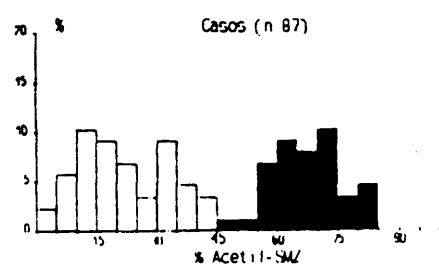
El porcentaje medio de acetil-sulfametazina en cada uno de los fenotipos es significativamente más alto para los controles que para los pacientes de nuestra serie. Tal y como se muestra en la figura 3 esta diferencia se debe al bajo porcentaje de sulfametazina acetilada en los pacientes afectados de carcinoma microcítico.

Análisis conjunto de ambos polimorfismos

En 71 pacientes se realizó la determinación de fenotipos oxidativo y acetilador, habiéndose encontrado 3 casos de oxidadores lentos. De estos 3 casos, 2 eran acetiladores lentos y 1 rápido. No existe correlación estadística entre el valor de la tasa metabólica de

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

debrisoquina y el porcentaje de acetilsufametazina en plasma.



Acetiladores lentos
 Acetiladores rapidos

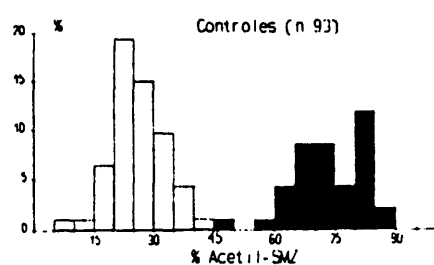


Figura 2

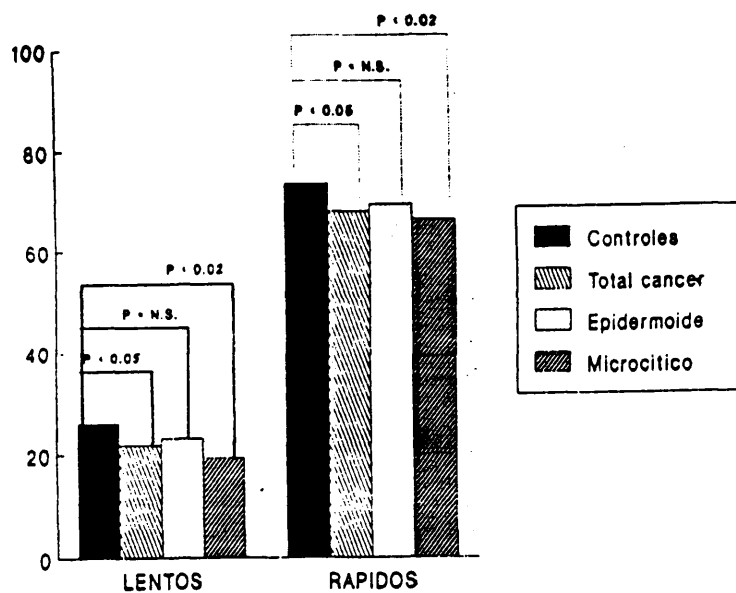
Distribución de frecuencias de los valores de las tasas de acetilación de sulfametacina en pacientes con cáncer de pulmón (arriba) y en controles (abajo). La separación entre acetiladores lentos y acetiladores rápidos se establece en el valor del 45% de sulfametacina total en su forma acetilada.

TABLA 20

POLIMORFISMO ACETILADOR EN CANCER DE PULMON
(SEGUN SUBTIPOS HISTOLOGICOS)

TIPO HISTOLOGICO	Nº CASOS	Nº ACETIL LENTOS (%)
Epidermoide	48	27 (56.2)
Microcítico	27	16 (59.2)
Adenocarcinoma	11	4 (36.4)
Células Grandes	1	1
Controles	93	54 (58.1)

Figura 3
DISTRIBUCION DEL PORCENTAJE MEDIO DE ACETIL-SULFAMETAZINA
EN AMBOS FENOTIPOS



istribución del porcentaje medio de acetil-sulfametacina en ambos fenotipos, comparando controles frente al conjunto de pacientes con cáncer de pulmón y frente a los subtipos epidermoide o microcítico. El porcentaje medio de acetil-sulfametazina en cada uno de los fenotipos es significativamente más alto para los controles que en los pacientes de nuestra serie. Esta diferencia se debe al bajo porcentaje de sulfametazina acetilada en los pacientes afectados de carcinoma microcítico.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

DISCUSION

FENOTIPO OXIDATIVO

Como se ha mencionado, la distribución del fenotipo oxidativo no difiere entre pacientes afectos de carcinoma de pulmón y controles. La edad media del grupo control es inferior al grupo de pacientes estudiados; sin embargo, está establecido que el envejecimiento no modifica significativamente la capacidad oxidativa de debrisoquina (Steiner, 1985).

La distribución de frecuencias de los valores de la tasa metabólica de debrisoquina no muestra tampoco diferencias entre ambos grupos.

Aunque se ha cuestionado durante años la asociación entre el tabaquismo y la histología adenocarcinoma (Doll, 1950), en la actualidad se acepta la existencia de dicha asociación, si bien en un grado menor (Lubin, 1984). Una valoración desde un punto de vista patogénico y epidemiológico (la relación tabaquismo/cáncer de pulmón), invitaría a un análisis por separado de los subgrupos histológicos más incriminados (epidermoide-microcítico). En nuestro análisis existe

un predominio significativo del fenotipo oxidativo rápido en los 71 pacientes con las variedades de cáncer de pulmón relacionado de forma inequívoca e intensa con el tabaquismo. Este hallazgo coincide parcialmente con publicaciones previas como las de de Ayesh (1984) y Law (1989). Por el contrario, dos estudios, en especial el de Roots, con importante casuística (n=270) han publicado resultados diferentes (Roots-Drakoulis, 1988; Speirs, 1990), no encontrando realización con el polimorfismo oxidativo de debrisoquina (tabla 10) .

En aquellas situaciones en el seno de la investigación clínico -por otro lado frecuentes- en que existen diversos estudios que muestran una diferencia que no alcanza significación estadística, atribuible al tamaño de la población estudiada, puede practicarse un análisis estadístico consistente en la fusión de los datos de diversos estudios (metanálisis). Este procedimiento ha sido utilizado en la valoración de la literatura de quimioterapia adyuvante en el cáncer de mama (Peto, 1984). En nuestro caso la valoración conjunta de los 5 estudios realizados hasta la fecha (tabla 21) permite obtener resultados significativos (p

TABLA 21
SERIES PUBLICADAS DE POLIMORFISMO OXIDATIVO

AUTORES	NR CASOS	% METABOL RAPIDOS	% METABOL RAPIDOS CONTROLES
Ayesh, 1984	245	1.6	9.0
Law, 1989	104	1.9	8.7
Roots, 1988	270	7.0	11.1
Speirs, 1990	82	8.0	-
Serie propia	84	4.8	7.0
Total series	785	4.7	9.5

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

< 0.001), que indican un exceso de oxidadores rápidos entre los pacientes con cáncer de pulmón.

Puede enunciarse, por tanto, como un hecho (no definitivamente establecido) la existencia de una asociación estadística significativa entre la posesión de un fenotipo oxidativo rápido de debrisoquina y el padecimiento de cáncer de pulmón. Como siempre sucede en el quehacer científico, el hecho encontrado, el hallazgo, ha de ser interpretado. Obviamente, la interpretación más inmediata y al mismo tiempo más atractiva es que, en efecto, el fenotipo oxidativo rápido de debrisoquina puede favorecer la aparición de cáncer de pulmón (en conjunto con otros factores como el tabaquismo), constituyendo así un factor de susceptibilidad genética.

Pero existen diversas cuestiones problemáticas a este respecto, que requieren una valoración cuidadosa:

En primer lugar, actualmente se sabe que la debrisoquina-hidroxilasa no metaboliza ni activa

ninguno de los precarcinógenos conocidos e implicados en el cáncer de pulmón (Hunt, 1984; Plummer, 1986; Shimada, 1989). De esta forma, no existiría ninguna base bioquímica teórica para la asociación fenotipo metabolizador rápido-cáncer de pulmón (Kalow, 1987).

En segundo lugar, algo más del 90% de la población fumadora tiene fenotipo oxidativo metabolizador rápido para debrisoquina y de este porcentaje solo unos pocos individuos fumadores llegan a presentar carcinoma bronquial. Es decir, *el fenotipo oxidativo de debrisoquina puede ser simplemente un factor de riesgo más dentro de la constelación de factores que potencialmente intervienen en la génesis de esta neoplasia, y no un factor causal de primera magnitud.* Ciertamente, cuantos más factores sean conocidos mayores serán las posibilidades de predecir el desarrollo de un tumor, aunque la trascendencia clínica de cualquiera de ellos por separado sea pequeña.

El problema de la asociación estadística entre la posesión de un fenotipo oxidativo metabolizador rápido y el padecimiento de cáncer de pulmón, puede ser visto desde otro punto de vista, por cierto muy sugerente.

Puede suceder que la secuencia de eventos sea distinta: en vez de favorecer el fenotipo oxidativo rápido el desarrollo de una neoplasia pulmonar, podría ocurrir lo contrario. Sería posible quizá que la presencia del tumor aumente la capacidad oxidativa y favorezca el cambio hacia un fenotipo rápido. Este paradójico fenómeno puede tener lugar en especial en un subtipo histológico: carcinoma indiferenciado de células pequeñas (microcítico). La conocida producción de polipéptidos con actividad endocrina por este tumor interfiere en la regulación del citocromo P-450, al menos en algunas especies (ratas) (MacGeoch, 1984).

Otra posibilidad es que la supervivencia de los metabolizadores rápidos con cáncer fuera mayor, como se ha sugerido por un lado (Evans, 1983) y negado por otro (Ladero, 1985), en el caso del polimorfismo acetilador en el carcinoma vesical. En este sentido, solo podemos señalar que todos nuestros pacientes de cáncer de pulmón estaban recién diagnosticados, y, por lo tanto, este sesgo no se puede haber producido en nuestro estudio.

En cualquier caso, en los estudios prospectivos existe siempre la posibilidad de que el propio tumor

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

pueda ejercer un efecto sobre la actividad oxidativa. Puede ser muy difícil realmente establecer si el fenotipo oxidativo es una causa o un efecto del tumor. Estudios ulteriores en familiares del paciente pueden ayudar a evaluar la posible susceptibilidad genética al padecimiento de un tumor dado.

En definitiva, en lo referente a la hipótesis de carcinogénesis a través de la oxidación mediada se pueden esbozar como argumentos de índole experimental en contra:

1. No se conoce carcinógeno pulmonar que siga la vía metabólica de la enzima P-450 db1
2. Los carcinógenos identificados hasta la fecha siguen otras vías metabólicas
3. No todas las isoenzimas tienen polimorfismo genético ni es igual el grado de inducibilidad
4. Es muy probable que la búsqueda de una relación carcinógeno-tumor pueda ser excesivamente simplista, porque existe frecuentemente un solapamiento de sustratos y de enzimas, de forma que un solo

carcinógeno puede ser metabolizado por diversas enzimas (y viceversa). Esto hace complicada y dificultosa la simple identificación de una vía única de carcinogénesis en un tumor concreto.

Por último, el hallazgo de una asociación de posible trascendencia clínica, dista mucho de ser sencilla, y se logra solo tras sucesivas labores de investigación que han de ser formalmente rigurosas. Conseguir una simple relación estadística (la convencional $p < 0.05$) evidentemente no es suficiente. Así, también pueden estar involucrados *problemas metodológicos* (metodológico-estadísticos):

Los estudios de distribución de polimorfismos enzimáticos genéticos en pacientes con tumores deben cumplir ciertas condiciones mínimas. Una de ellas es que la determinación del fenotipo debe efectuarse poco después del diagnóstico. Otra condición básica es que -como es obvio- el estudio ha de tener un *poder* estadístico suficiente como para detectar diferencias relativamente pequeñas (<20%). Consecuencia inmediata es que la serie debe tener un tamaño apropiado (incluso un total de 100 pacientes puede ser insuficiente). Por

último, las discrepancias entre estudios pueden ser atribuidas a diferencias sutiles de selección entre las poblaciones sometidas a escrutinio, que alterarían los resultados de forma subrepticia.

Ciertamente siempre hay que tener en cuenta la posibilidad de que la asociación entre fenotipo oxidativo de debrisoquina rápido y determinadas neoplasias pueda no ser causal, sino vinculada a otros factores. Por ejemplo, puede suceder que la presencia del fenotipo oxidativo rápido se asocie a cualquier situación que sí esté implicada causalmente en la carcinogénesis pulmonar. Podría existir así una asociación con genes reguladores o estructurales del sistema citocromo P-450 (Kouri, 1982), o puede ligarse a genes (no relacionados en sí con la carcinogénesis química) como oncogenes celulares, que realmente sí tengan un papel causal en la génesis del tumor (Ayesh, 1984).

De esta forma, hallaríamos una simple asociación estadística con un elemento (en nuestro caso el fenotipo oxidativo de debrisoquina), que a su vez

estaría asociado a un segundo elemento (o tercero, o aun más remoto), el cual a su vez sí podría estar vinculado causalmente a la carcinogénesis. Esto explicaría, por ejemplo, la debilidad de la asociación hallada.

Por último, el procedimiento de metaanálisis está sujeto a la posibilidad de sesgos múltiples, en gran medida inevitables. Es cierto que la conjunción de series de pacientes a través de este procedimiento permite lograr una serie global de tamaño suficiente como para hacer significativos los resultados. Sin embargo, la inclusión de pacientes de procedencia heterogénea es poco atractiva y se presta a conclusiones inseguras o cuestionables. Además, la consecución así de la (ansiosa) significación estadística no traduce una diferencia mayor entre los grupos sometidos a valoración. Una $p < 0.001$ (en vez de la convencional $p < 0.05$), no implica necesariamente que la diferencia de resultados sea más abultada, ni que sea más cierta la hipótesis, sino que expresa más bien que es menor la probabilidad de que la pequeña diferencia encontrada se deba al azar. En pocas palabras, una serie más grande no encuentra diferencias

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

de mayor tamaño, sino más fiables. Incluso puede afirmarse que la necesidad de recopilar los datos de diversas series, a fin de conseguir significación estadística, hace más llamativa la pequeñez del resultado encontrado, y menor la trascendencia clínica esperable del mismo.

En definitiva, quedan aun cuestiones por aclarar y habrá que esperar ulteriores estudios para establecer conclusiones definitivas.

FENOTIPO ACETILADOR

No hemos hallado diferencias en la distribución del fenotipo acetilador entre pacientes afectados de cáncer de pulmón y controles. Esta conclusión se mantiene para pacientes con los subtipos implicados directa- y estrechamente con el consumo de tabaco (subtipos epidermoide y microcítico).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos, en el sentido de que no se ha encontrado relación con el fenotipo acetilador (Roots, 1985; Burguess, 1985; Philip, 1988) (Tabla 22).

Sin embargo, el análisis por separado según fenotipo permite detectar tasas más bajas de acetilación en los pacientes que en los correspondientes controles. Esta menor capacidad acetiladora es debida a los resultados obtenidos en pacientes con carcinoma microcítico. Pensamos que este hallazgo puede ser consecuencia del padecimiento de este tumor, quizá a través del bloqueo parcial en la síntesis o en la actividad de la enzima N-acetiltransferasa. Como uno de las condiciones básicas de participación del estudio es la ausencia de tratamiento quimioterápico previo, no puede atribuirse

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

a ésta manipulación farmacológica la disminución de la capacidad acetiladora. Se puede apuntar incluso que esta variación puede ser un efecto paraneoplásico.

Como hallazgo contrapuesto al citado, Burgess (1985) encuentra en los pacientes con carcinoma epidermoide clasificados como acetiladores lentos unas tasas de acetilación más elevadas que en controles de igual fenotipo.

En definitiva, pensamos que el polimorfismo acetilador no guarda relación con la presencia de cáncer de pulmón. Esta opinión queda avalada por los 4 estudios publicados hasta la fecha (en total 486 pacientes), todos en el mismo sentido.

En lo que a ambos polimorfismos enzimáticos se refiere, no hemos encontrado correlación alguna, como era de esperar, ya que ambos metabolismos son independientes. Este hallazgo concuerda con el expresado previamente por Harmer (1986).



TABLA 22
SERIES PUBLICADAS DE POLIMORFISMO ACETILADOR

AUTORES	Nº CASOS	% METABOL LENTOS	% METABOL LENTOS CONTROLES
Roots, 1988	220	50.5	53.5
Burguess, 1985	53	60.4	58.1
Philip, 1988	126	46.0	53.5
Nuestro Grupo	87	55.2	58.1

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se ha estudiado la distribución del polimorfismo oxidativo de debrisoquina y/o del polimorfismo acetilador de sulfametazina en un grupo de 100 pacientes con cáncer de pulmón. Dicha distribución se ha comparado con la distribución de ambos polimorfismos en sendos grupos control, tomados de una muestra aleatoria de población española. Se ha realizado un análisis por separado del grupo de pacientes con los subtipos histológicos de cáncer de pulmón con una relación epidemiológica y experimental más estrecha con el consumo de tabaco (carcinoma epidermoide y carcinoma microcítico).

1. En el estudio de *polimorfismo oxidativo de debrisoquina* sobre el grupo completo analizado de 84 pacientes no se han encontrado diferencias con significación estadística.

2. Existe una proporción significativamente más baja de metabolizadores oxidativos lentos en pacientes con

subtipos epidermoide y microcítico que en sujetos del grupo control.

3. En el estudio del *polimorfismo acetilador de sulfametazina*, sobre 87 pacientes, la distribución de frecuencias de sujetos con fenotipo acetilador lento o rápido no ha mostrado diferencias significativas frente a la población control.

4. Hemos observado que en pacientes con *carcinoma microcítico* las tasas medias de acetilación, tanto en acetiladores lentos como en acetiladores rápidos, son inferiores, respectivamente, a las existentes en el grupo control. Apuntamos como posible explicación que esta capacidad acetiladora disminuida sea de origen paraneoplásico, debido a un hipotético efecto inhibitor sobre la síntesis o la actividad enzimática.

5. No se ha detectado *correlación* entre la capacidad oxidativa de debrisoquina y la capacidad acetiladora de sulfametazina, hallazgo que confirma estudios previos que establecen la independencia de ambos procesos.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

En resumen, en nuestro estudio se ha hallado una relación entre fenotipo oxidativo rápido de debrisoquina y el padecimiento de carcinoma epidermoide o microcítico de pulmón. No es posible establecer inequívocamente si esta relación es o no de naturaleza etiológica. Es posible que la presencia de un fenotipo oxidativo rápido de debrisoquina sea un factor de riesgo para el desarrollo de los subtipos histológicos de cáncer de pulmón relacionados con el uso de tabaco. Se objetivaría así una susceptibilidad genéticamente mediada que interaccionaría con factores exógenos, en especial el consumo de tabaco, en el desarrollo de la neoplasia más frecuente en países desarrollados.

El polimorfismo acetilador de sulfametazina no guarda relación con el padecimiento de cáncer de pulmón.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Alarcón-Segovia D.; Fishbein E.; Alcola H.:
*"Isoniazid acetylation rate and development of
antinuclear antibodies upon isoniazid treatment".*
ARTHRITIS RHEUM. 1971; 14: 748-752.

Alarcón-Segovia D.: *"Drug-induced antinuclear
antibodies and lupus syndromes".*
DRUGS 1976; 69-77.

Al-Dabbagh S.G.; Idle J.R.; Smith R.L.: *"Animal
modelling of human polymorphic drug oxidation. The
metabolism of debrisoquine and phenacetin in rat inbred
strains".*
J. PHARM. PHARMACOL. 1981; 33: 161-164.

American Conference of governmental industrial
hygienist inc. "
DOCUMENTATION OF THE THREE HOLD LIMITS VALUES,
Cincinnati. 1980

Ames B.: *"Dietary carcinogens and anticarcinogens. "*
J TOXICOL CLIN TOXICOL 22:291-301, 1984

Arvela P.; Kirjarinta M.; Kirjarinta M.; Kärki W.;
Pelkor D.: *"Polymorphisms of debrisoquine hydroxylation
among Finn and Lapps".*
Abstract, Symposium on enzyme induction, Turku,
Finland, Aug. 1986.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Ayesh R.; Idle J.R.; Ritchie J.C.; Crothers M.J.; Heizel M.R.: "Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer".
NATURE 1.984; 312: 169-170.

Baer A.M.; McAllister C.B.; Wilkinson G.R.; Woosley R.L.; Pincus T.: "Altered distribution of debrisoquine oxidation phenotypes in patients with systemic lupus erythematosus".
ARTHRITIS RHEUM. 1.986; 29: 843-850.

Balant-Gorgia AE, Schulz P, Dayer P et al.: "Role of oxidation polymorphism on blood and urine concentrations of amitriptyline and its metabolites in man."
PSYQUIATR NEUROL SCI 232:215-222, 1.982

Baron A.J.: "Cigarette smoking and Parkinson's disease".
NEUROLOGY 1.986; 36: 1.490-1.496.

Batchelor J.; Welsh K.I.; Mansilla-Tinoco R.; Collery C.T.; Hughes G.R.V.; Bernstein R.; Ryan P.; Naish P.F.; Aber Bing R.F.; Russell G.I.: "Hydralazine-induced systemic lupus erythematosus: influence of HLA-DR and sex on susceptibility".
LANCET 1.980; 1: 1.107-1.109.

Baumann R.J.; Jameson H.D.; McKean H.E.; Haack D.G.; Weisberg L.M.: "Cigarette smoking and Parkinson's

disease: 1. A comparison of cases with matched neighbors".

NEUROLOGY 1.980; 30: 839-843.

Beaudry P.H.; Brickman H.F.; De Vise N.; MacDougall D.; "Liver enzyme disturbances during isoniazid chemoprophylaxis in children".

AM. REV. RESPIR. DIS. 1.974; 110: 581-584.

Beek B, Aranda I, Thomson E.: "Induction of sister chromatid exchanges, cell-cycle delay and chromosomal aberrations by human urine concentrates."

MUTATION RES 92:333, 1.982

Benet LZ, Sheiner LB.: "Farmacocinética: dinámica de la absorción de las drogas". In:

LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA. Ed Panamericana. Madrid 1.986:1.9-48

Benítez J.; Cobaleda J.; Lozano L.; Elena A.; Cermeno J.A.; Marín J.: "Debrisoquine oxidation phenotype in a Spanish population".

ACTA PHARMACOL. TOXICOL. (COPENH.) 1.986; Suppl. V: 216.

Benítez J.; Ladero JM; Jiménez FJ: "Oxidative polymorphism of debrisoquine in Parkinson's disease".

J NEUROL NEUROSURG PSYCH 1.990 (in press)

Bertilsson L.; Dengler H.J.; Eichelbaum M.; Schulz H.U.: "Pharmacogenetic covariation of defective N-

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

oxidation of sparteine and 4-hydroxylation of debrisoquine".

EUR. J. CLIN. PHARMACOL. 1980; 17: 153-155.

Bodansky H.J.; Drury P.L.; Cudworth A.G.; Price Evans D.A.: "Acetylator phenotypes and type I (Insulin-dependent) diabetics with microvascular disease".

DIABETES 1981; 30: 907-910.

Boehm TLJ.: "Oncogenes and the genetic dissection of human cancer: implications for basic research and clinical medicine".

PROGRAM CLIN BIOCHEM MED 2:1-48, 1985

Boobis A.R.; Murray S.; Kahn G.C.; Robertz G.M.; Davies D.S.: "Substrate specificity of the form of cytochrome P450 catalyzing the 4-hydroxylation of debrisoquine in man".

MOL. PHARMACOL. 1983; 23: 474-481.

Boobis AR, Murray R, Hampden CE et al.: "Genetic polymorphism in drug oxidation: in vitro studies of human debrisoquine 4-hydroxylase and bufuralol 1'-hydroxylase activities".

BIOCHEM PHARMACOL 34:65-71, 1985

Boobis A.R.; Speirs C.J., Murray S. et al.: "Debrisoquine metabolic phenotype in patients with bronchogenic carcinoma".

BR J CLIN PHARMACOL 27:646-647, 1989

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Branch R.A.; Wilkinson G.R.; McAllister C.B.; Ray W.; Kaisary A.; Smith P.: *"Association of polymorphic oxidative drug metabolism, cigarette smoking and alcohol consumption with bladder cancer"*.

CLIN. RES. 1.985; 33: 527 A.

Brewer GJ: *"Human ecology and expanding role for the human geneticist"*.

AM J HUM GENET 23:92-94, 1.971

Brosen K.; Gram L.F.; Haghfelt T.; Bertilsson L.: *"Extensive metabolizers of debrisoquine become poor metabolizers during quinidine treatment"*.

PHARMACOL. TOXICOL. 1.987; 60: 312-314.

Buchanan N.; Strickwold B.; Shuenyane E.: *"Isoniazid inactivation in black patients with tuberculosis"*.

S. AFR. MED. J. 1.976; 50: 463-465.

Bulovskaya L.N.; Krupkin R.G.; Bochina T.A.; Shipkova A.A.: *"Acetylator phenotype in patients with breast cancer"*.

ONCOLOGY 1.978; 35: 185-188.

Burguess EJ, Traford JAP: *"Acetylator phenotype in patients with lung carcinoma -a negative report."*

EUR J RESP DIS 1.985, 67, 17-1.9 ;

Burrows A.W.; Hockaday T.D.R.; Mann J.I.; Taylor J.G.: *"Diabetic dimorphism according to acetylator status"*.

BR. MED. J. 1.978; 1: 208-210.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Caporase N, Hayes R, Dosemeci M et al: "*Debrysoquine metabolic phenotype (MP), asbestos exposure, and lung cancer*" (abs).

Proc ASCO 6:229, 1.987

Caporase N, Hayes R, Dosemeci M et al: "*Lung cancer risk and the Debrysoquine metabolic phenotype*".

CANCER RES 3675-79, 1.989

Cartwright R.A.; Rogers H.J.; Barham-Hall D.; Glashan R.V.; Ahmad R.A.; Higgins E.: "*Role of N-acetyl-transferase phenotypes in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetic approach to bladder cancer*".

LANCET 1.982; 2: 842-846.

Cartwright R.A.; Philip P.A.; Rogers H.J.; Glashan R.V.: "*Genetically determined debrisoquine oxidation capacity in bladder cancer*".

CARCINOGENESIS 1.984; 5: 1.1.91-1.1.92.

Chapron D.J.; Kramer P.A.; Mercik S.A.: "*Kinetic discrimination of three sulfamethazine acetylation phenotypes*".

CLIN. PHARMACOL. THER. 1.980; 27: 104-113.

Chapron D.J.; Kramer P.A.; Mercik S.A.: "*Potential influence of body weight on the clearance of polymorphically acetylated drugs*".

J. CLIN. PHARMACOL. 1.982; 22: 271-275.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Clark D.W.J.: "Genetically determined variability in acetylation and oxidation. Therapeutic implications".
DRUGS 1.985; 29: 342-375.

Clark DWJ.: "Genetically determined variability in acetylation and oxidation. Therapeutic implications. "
DRUGS 29:342-375, 1.985

Cobaleda J. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura (en prensa)

Cohen BH: "Is pulmonary dysfunction the common denominator for the multiple effects of cigarette smoking?"
LANCET 2:1024-1026, 1.978

Curvall M, Romert L, Norlen E et al.: "Mutagen levels in urine from snuff users, cigarette smokers and non-tobacco users -A comparison."
MUTATION RES 188:105-110, 1.987

Davies D.M.; Beedie M.A.; Rawlins M.D.: "Antinuclear antibodies during procainamide treatment and drug acetylation".
BR. MED. J. 1.975; 3: 682-683.

Dawson GV, Vestal RE.: "Smoking and drug metabolism."
PHARMACOL THER 15:207-211, 1.982

Deboret R.: "Tests bacterianos de sustancias potencialmente cancerígenas. "

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

EL CANCER Santos E, Rodriguez J (eds) Ed Grafesa
(Barcelona (1.987)

Desch F.: *"Significance of various enzymes in the control of mutagenic and carcinogenic metabolites derived from aromatic structures. "*
TOXICOL PATHOL 12:391-396, 1.984

Dickinson D.S.; Bailey W.C.; Hirschowitz B.I.; Soong S.J.: *"The effect of acetylation status on isoniazid (INH) hepatitis".*
AM. REV. RESPIR. DIS. 1.977; 115: 395.

Dickinson D.S.; Bailey W.C.; Hirschowitz D.I.; Soong S.J.; Eidus L.; Hodgkin M.K.: *"Risk factors for isoniazid (INH) induced liver dysfunction".*
J. CLIN. GASTROENTEROL. 1.981; 3: 271-279.

Distlerath L.M.; Guengerich F.P.: *"Characterization of a human liver cytochrome P-450 involved in the oxidation of debrisoquine and other drugs by using antibodies raised to the analogous rat enzyme".*
PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 1.984; 81: 7.348-7.352.

Doll R, Hill AB: *"Smoking and carcinoma of the lung."*
BR MED J 2:739-748, 1.950

Doll R, Peto R.: *"The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. "*
JNCI 6:1191-1308, 1.981

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Drakoulis M.; Minks T.; Ploch M.; Otte F.; Heinemeyer G.; Kampf D.; Loddenkemper R.; Roots I.; *"Questionable association of debrisoquine hydroxylator phenotype and risk for bronchial carcinoma"*.

ACTA PHARMACOL. TOXICOL. (COPENH.) 1.986; Suppl. V: 220.

Drayer D.E.; Reidenberg M.M.: *"Clinical consequences of polymorphic acetylation of basic drugs"*.

CLIN. PHARMACOL. THER. 1.977; 22: 251-258.

Dellon AL, Rogentine GN, Chretien PB.: *"Prolonged survival in bronchogenic carcinoma associated with HLA-A antigens W-1.9 and HL-A5: a preliminary report"*.

JNCI 54:1283, 1286, 1.975

Dubey RK, Singh J.: *"Localization and characterization of drug-metabolizing enzymes along the villus-crypt surface of the rat small intestine-I. Monooxygenases."*

BIOCHEM PHARMACOL 37:169-176, 1.988

Du Souich P.; Courteau H.: *"Induction of acetylating capacity with complete Freund's adjuvant and hydrocortisone in the rabbit"*.

DRUG. METABOL. DISP. 1.981; 9: 279-283.

Ehrich M, Aswell JE, Van Tasell RL, et al: *"Mutagens in the faeces of 3-South African population at risk for colon cancer"*.

MUTAT RES 64:231-240, 1.979

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Eichelbaum M.; Spannbrucker N.; Dengler H.J.:
"Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect".

EUR. J. CLIN. PHARMACOL. 1.979; 16: 183-187.

Eichelbaum M.: *"Defective oxidation of drugs: pharmacokinetic and therapeutic implications".*

CLIN. PHARMACOKINET. 1.982; 7: 1-22.

Eichelbaum M.; Bertilsson L.; Säwe J.; Zekorn C.:
"Polymorphic oxidation of sparteine and debrisoquine: related pharmacogenetic entities".

CLIN. PHARMACOL. THER. 1.982; 31: 184-186.

Eichelbaum M.; Woolhouse N.M.: *"Inter-ethnic differences in sparteine oxidation among Ghanaians and Germans".*

EUR. J. CLIN. PHARMACOL. 1.985; 28: 79-83.

Eichelbaum M.; Mineshita S.; Ohnhaus E.E.; Zekorn C.:
"The influence of enzyme induction on polymorphic sparteine oxidation".

BR. J. CLIN. PHARMACOL. 1.986; 22: 49-53.

Eichelbaum M.; Baur M.P.; Dengler H.J.; Osikowska-Evers B.O.; Tieves G.; Zekorn C.; Rittner C.:
"Chromosomal assignment of human cytochrome P-450 (debrisoquine/sparteine type) to chromosome 22".

BR. J. CLIN. PHARMACOL. 1.987; 23: 455-458.

Ellard G.A.: *"Variations between individuals and populations in the acetylation of isoniazid and its*

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

significance for the treatment of the pulmonary tuberculosis".

CLIN. PHARMACOL. THER. 1.976; 19: 610-625.

Ellard G.A.; Mitchison D.A.; Girling D.J.; Munn A.J.;
Fox W.: *"The hepatic toxicity of isoniazid among rapid
and slow acetylators of the drug"*.

AM. REV. RESPIR. DIS. 1.978; 118: 628-629.

Ellard G.A.; Girling D.J.; Munn A.J.: *"The
hepatotoxicity of isoniazid among the three acetylator
phenotypes"*.

AM. REV. RESPIR. DIS. 1.980; 121: 568.

* Estapé JL, Agustí A, Font A et al.: *"Tabaco y cáncer."*

"
MED CLIN 89:30-37, 1987

Estay S.; Armas R.; Busel I.; Baier E.; Wolff C.;
Jabsa Z.: *"Vigilancia de efectos adversos sobre el
hígado de una combinación de drogas antituberculosas"*.

REV. MED. CHIL. 1.981; 109: 212-220.

Evans D.A.P.; Manley K.A.; McKusick V.A.: *"Genetic
control of isoniazid metabolism in man"*.

BR. MED. J. 1.960; 2: 485-491.

Evans D.A.P.; White T.H.: *"Human acetylation
polymorphism"*.

J. LAB. CLIN. MED. 1.964; 63: 394-403.

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

Evans D.A.P.; Bullen M.F.; Houston J.; Hopkins C.A.; Vettors J.M.: *"Antinuclear factor in rapid and slow acetylator patients treated with isoniazid"*.
J. MED. GENET. 1.972; 9: 53-56.

Evans D.A.P.; Eze L.C.; Whibley E.J.: *"The association of the slow acetylator phenotype with bladder cancer"*.
J. MED. GENET. 1.983; 20: 330-333.

Evans D.A.P.; Harmer D.; Downham D.Y.; Whibley E.J.; Idle J.R.; Ritchie J.; Smith R.L.: *"The genetic control of sparteine and debrisoquine metabolism in man with new methods of analysing bimodal distributions"*.
J. MED. GENET. 1.983; 20: 321-329.

Evans D.A.P.; Paterson S.; Francisco P.; Alvarez G.: *"The acetylator phenotypes of Saudi Arabian diabetics"*.
J. MED. GENET. 1.985; 22: 479-483.

Evans D.A.P.: *"N-acetyltransferase"*.
PHARMACOL THER 1989, 42:157-239

Falck K, Sorsa M, Vainio et al.: *"Mutagenicity in urine of workers in rubber industry."*
MUTATION RES 79:45, 1980

Farah F.; Taylor W.; Rawlins M.D.; James O.: *"Hepatic drug acetylation and oxidation: effects of aging in man"*.
BR. MED. J. 1.977; 2: 155-156.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Fishbein E.; Alarcón-Segovia D.: *"Phenotypically low acetyl transferase activity: a characteristic of SLE".*
ARTHRITIS RHEUM. 1.976; 19: 796.

Fishbein E.; Alarcón-Segovia D.: *"Slow acetylation phenotype in systemic lupus erythematosus".*
ARTHRITIS RHEUM. 1.979; 22: 95-96.

Florin I, Rutberg L, Curvall M.: *"Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' test."*
TOXICOLOGY 18:219-232, 1.980

Foad B.; Litwin A.; Zimmer H.; Hess E.V.: *"Acetylator phenotype in systemic lupus erythematosus".*
ARTHRITIS RHEUM. 1.977; 20: 815-818.

Fonne-Pfister R, Meyer UA: *"Xenobiotic and endobiotic inhibitors of cytochrome P-450 db1 function, the target of the debrisoquine/sparteine type polymorphism".*
BIOCHEM PHARMACOL 1.988; 37:3829-3835

Friedman FK, Vest D, Sugimura T et al.: *"Flavone modulators of rat hepatic arylhydrocarbon hydroxylase."*
PHARMACOLOGY 31:203-7, 1.985

Giardina E.G.; Dreyfuss J.; Bigger J.T.; Shaw J.M.; Schreiber E.C.: *"Metabolism of procainamide in normal and cardiac subjects".*
CLIN. PHARMACOL. THER. 1.976; 1.9: 339-351.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Girling D.J.: *"The hepatic toxicity of antitubercular regimes containing isoniazid, rifampicin and pyrazinamide"*.

TUBERCLE 1.978; 59: 13-32.

Glowinski I.B.; Radtke H.E.; Weber V.W.: *"Genetic variation in N-acetylation of carcinogenic arylamines by human and rabbit liver"*.

MOL. PHARMACOL. 1.978; 14: 940-949.

Godeau P.; Aubert M.; Imbert J.C.; Herreman G.: *"Lupus érythémateux disséminé et taux d'isoniazide actif. étude de 47 observations"*.

ANN. M&D. INTERNE 1.973; 124: 181-186.

González FJ, Skoda RC. Sloan TP et al: *"Characterisation of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism"*.

NATURE 331, 442, 1.988

Goth A.: *"Farmacogenética: respuesta individual a los fármacos"*. In:

FARMACOLOGIA MEDICA. ED. DOYMA. BARCELONA 1.986:48-59

Grant D.M.; Tang B.K.; Kalow V.: *"A simple test for acetylator phenotype using caffeine"*.

BR. J. CLIN. PHARMACOL. 1.984; 17: 459-464.

Grant D.M.; Mörke K, Echelbaum M et al: *"Acetylation pharmacogenetics: The slow acetylator phenotype is*

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

caused by decreased or absent arylamine *N*-acetyltransferase in human liver".

J CLIN INVEST 1990; 85:968-72

Gronhagen-Riska C.; Hellstrom P.E.; Proseth B.:
"Predisposing factors in hepatitis induced by isoniazid-rifampin treatment of tuberculosis".

AM. REV. RESPIR. DIS. 1.978; 118: 461-466.

Guengerich F.P.; Distlerath L.M.; Reilly P.E.B.;
Wolff T.; Shimada T.; Umbenhauer D.P.; Martin M.V.:
"Human-liver cytochromes P-450 involved in polymorphisms of drug oxidation".

XENOBIOTICA 1.986; 16: 367-368.

Guengerich FP, Umbenhauer DR, Churchill PF et al.:
"Polymorphism of human cytochrome P-450".

XENOBIOTICA 17:311-316, 1.987

Guengerich FP, "Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy."

CANCER RES 198;48:2946-34

Gurumurthy P.; Krishnamurthy M.S.; Nazareth R.;
Parthasanth R.; Raghupati Sarma G.; Somasundaram
P.R.; Tripathy S.P.; Ellard G.A.: "Lack of relationship between hepatic toxicity and acetylator phenotype in three thousand South Indian patients during treatment with isoniazid for tuberculosis".

AM. REV. RESPIR. DIS. 1.984; 129: 58-61.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Halmekoski J.; Mattila M.J.; Mustakallio K.K.:
*"Metabolism and haemolytic effect of dapsone and its
metabolisers in man"*.

MED. BIOL. 1.978; 56: 216-221.

Harmer D, Evans DAP, Eze LC et al: *"The relationship
between the acetylators and the esparteine hydroxylation
polymorphisms"*.

J MED GENET 1.986;23:155-156

Hayaishi O.: *"Oxygenases."*

ED O. Hayaishi, Academic New York, 1.962:1-29

Hein D.W.; Smolen T.N.; Fox R.R.; Weber W.V.:
*"Identification of genetically homozygous rapid and
slow acetylators of drugs and environmental carcinogens
among established inbred rabbit strains"*.

J. PHARMACOL. EXP. THER. 1.982; 223: 40-44.

Henningsen H.C.; Cederberg A.; Hanson A.; Johansson
B.: *"Effects of long-term treatment with procaine
amide"*.

ACTA MED. SCAND. 1.975; 1.98: 475-482.

Heinonen THM.: *"Metabolism of vinyl toluene in the
rat: effect of induction of the cytochrome P-450."*

BIOCHEM PHARMACOL 33:1585-1593, 1.984

Heizel M.R.; Law M.; Keal E.E.; Sloan T.P.; Idle
J.R.; Smith R.L.: *"Is there a genetic component in
bronchial carcinoma in smokers?"*.

THORAX 1.980; 35: 709.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Hill MJ.: "Environmental and genetic factors in gastrointestinal cancer". In: Sherlock P, Morson BC, Barabara L, Veronesi U (eds) Precancerous lesions of the gastrointestinal tract. Raven Press, New York, pp 1-22

Hinson SA, Freeman JP, Potter DW et al.: "Mechanisms of microsomal metabolism of benzene to fenol. " MOL PHARMACOL 27:574-577, 1.985

Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council: "Controlled trial of 6-month and 9-month regimens of daily and intermittent streptomycin plus isoniazid plus pyrazinamide for pulmonary tuberculosis in Hong Kong". AM. REV. RESPIR. DIS. 1.977; 115: 727-735.

Horai Y.; Ishizaki T.; Sasaki T.; Koya G.; Matsuyama K.; Iguchi S.: "Isoniazid disposition, comparison of isoniazid phenotyping methods in and acetylator distribution of Japanese patients with idiopathic systemic lupus erythematosus and control subjects". BR. J. CLIN. PHARMACOL. 1.982; 13: 361-374.

Horwitz RI, Smaldone LF, Viscoli C: "An ecogenetic hypothesis for lung cancer in women". ANN INT MED 148:2609-2612, 1.988

Hsu TC: "Invited review. Genetic predisposition to cancer with special reference to mutagen sensitivity". IN VITRO CELL DEV BIOL 23:591-603, 1.987

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Hughes H.B.; Biehl J.P.; Jones A.P.; Schmidt L.H.:
*"Metabolism of isoniazid in man as related with the
occurrence of peripheral isoniazid neuritis"*.
AM. REV. RESPIR. DIS. 1954; 70: 266-273.

Hunt PG.: *"In vitro characterization of sparteine
monoaminoxxygenase present in rat liver"*.
M. SC. THESIS. 1984. UNIVERSITY OF TORONTO

Iannuzzi MC, Miller YE.: *"Genetic predisposition to
lung cancer"*.
SEM RESP MED 7:327-332, 1986

Idle J.R.; Mahgoub A.; Sloan T.P.; Smith R.L.;
Mbanefo C.O.; Bababunmi E.A.: *"Same observations on the
oxidation phenotype status of Nigerian patients
presenting with cancer"*.
CANCER LETT. 1981; 11: 331-338.

Idle J.R.; Smith R.L.: *"The debrisoquine
hydroxylation gene: a gene of multiple consequence"*. In
Lemberger L.; Reidenberg M.M. (eds.)
Proceedings of the second world conference on clinical
pharmacology and therapeutics, American Society for
pharmacology and experimental therapeutics; Bethesda
1984, pp.: 148-164.

Illet K.F.; David B.M.; D'Etchon P.; Castleden V.M.;
Kwa R.: *"Acetylator status in patients with colorectal
carcinoma"*.
ACTA PHARMACOL. TOXICOL. (COPENH.) 1986; Suppl. V:
220.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Inaba T.; Otton S.V.; Kalow W.: *"Deficient metabolism of debrisoquine and sparteine"*.

CLIN. PHARMACOL. THER. 1.980; 27: 547-549.

Inaba T.; Otton S.V.; Kalow W.: *"Debrisoquine hydroxylation capacity: problems of assessment in two populations"*.

CLIN. PHARMACOL. THER. 1.981; 29: 216-223.

Inaba T.; Vinks A.; Otton S.V.; Kalow W.: *"Comparative pharmacogenetics of sparteine and debrisoquine"*.

CLIN. PHARMACOL. THER. 1.983; 33: 394-399.

Inaba T.; Hakano M.; Otton S.V.; Mahon W.A.; Kalow W.: *"A human cytochrome P-450 characterized by inhibition studies as the sparteine-debrisoquine monooxygenase"*.

CAN. J. PHYSIOL. PHARMACOL. 1.984; 62: 860-862.

International Agency for research on cancer.: *"Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans. "*

IARC MON 1:14-16, Lyon 1.982

Ishizaki T.; Horai Y.; Koya G.; Matsuyama K.; Iguchi S.: *"Acetylator phenotype and metabolic disposition of isoniazid in japanese patients with systemic lupus erythematosus"*.

ARTHRITIS RHEUM. 1.981; 24: 1.245-1.254.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Islam S.I.; Idle J.R.; Smith R.L.: "The polymorphic 4-hydroxylation of debrisoquine in a Saudi arab population".

XENOBIOTICA 1.980; 10: 819-825.

Izard C, Valaud-Barrieu D, Fayeulle JP et al.: "Influence des parametres de famage sur l'activite genotoxique de la phase gazeuse de fumee de cigarette, mesuree sur le lymphocyte humain et la levure. "

MUTATION RES 77:341, 1.980

Jacqz E.; Hall S.D.; Branch R.A.: "Genetically determined polymorphisms in drug oxidation".

HEPATOLOGY 1.986; 6: 1.020-1.032.

Jansson B.; Jankovic J.: "Low cancer rates among patients with Parkinson's Disease".

ANN. NEUROL. 1.985; 17: 505-509.

Jeffcoate CR Cytochrome.: "P-450 enzymes in sterol biosynthesis and metabolism". In: Ortiz de Montellano PR (ed) Cytochrome P-450: structure, mechanism and biochemistry. Plenum Press, New York London, 1.986 pp 387-428

Jenne J.W.: "Partial purification and biochemical properties of the isoniazid transacetylase in human liver. Its relationship to the acetylation on p-amino-salicylic acid".

INT. INVEST. 1.965; 44: 1.992-2.002.

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

Jerina DM, Jerina JV.: "Arene oxides: a new perspective of drug metabolism"
SCIENCE 185:573-582, 1.978

Johansson E.A.; Mustakallio K.K.; Mattila M.M.;
Tiilikainen A.: "Cutaneous reactions to drugs, acetylation phenotype and HLA antigens in patients with and without systemic lupus erythematosus (LES)".
ANN. CLIN. RES. 1.976; 8: 126-128.

Kahn G.C.; Boobis A.R.; Murray S.; Brodie M.J.;
Davies D.S.: "Assay and characterization of debrisoquine 4-hydroxylase activity of microsomal fractions of human liver".
BR. J. CLIN. PHARMACOL. 1.982; 13: 637-645.

Kaisary A.; Smith P.; Jacqz E.; McAllister C.B.;
Wilkinson G.R.; Ray W.A.; Branch R.A.: "Genetic predisposition to bladder cancer: ability to hydroxylate debrisoquine and mephenytoin as risk factors".
CANCER RES. 1.987; 47: 5.488-5.493.

Kalow W.: "Ethnic differences in drug metabolism".
CLIN. PHARMACOKINET. 1.982; 7: 373-400.

Kalow W.: "Genetic variation in the human hepatic Cytochrome P-450 System".
EUR J CLIN PHARMACOL 31:633-641, 1.987

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Kaplowitz M, AV TY, Simon FR et al.: *"A drug induced hepatotoxicity."*

ANN INT MED 104:826-939, 1.986

Kaufman DW, Helmrich ASP, Rosenberg.: *"Nicotine and carbon monoxide content of cigarette smoke and the risk of myocardial infarction in young men."*

BR J MED 287:324-326, 1.983

Kellermann GH, Shaaw CR, Luytgen-Kellermann.: *"Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and bronchial carcinoma"*.

N ENG J MED 289:934-937, 1.987

Khoury MJ, Beaty TH, Newill CA et al: *"Genetical enviromental interactions in chronic airways obstruction"*.

INT J EPIDEMIOL 15:65-72, 1.986

Köhler C.; Eriksson L.G.; Hansson T.; Warner M.; Ake-Gustafsson J.: *"Immunohistochemical localization of cytochrome P450 in the rat brain"*.

NEUROSCI. LETT. 1.988; 84: 109-114.

Kouri RE, Mc Kinney CE, Slomiany DJ et al.: *"Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analysed in cryopreserved lymphocytes"*.

CANCER RES 42:5030-5037, 1.982

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

Laires A, Borga H, Rueff J et al.: "Urinary mutagenicity in occupational exposure to mineral oils and iron oxide particles. "
CARCINOGENESIS 3:1077-1079, 1.982

La Du B.N.: "Isoniazid and pseudocholinesterase polymorphism".
FED. PROCL. 1.972; 31: 1.276-1.285.

La Vecchia C, Levi F, Gutzwiller F.: "Fumée et santé: une épidémie évitable"
MED HYG 45:3453-3462, 1.987

Ladero J.M.; Arrojo A.; Gilsanz V.: "Acetilación hepática en la población española".
GASTROENTEROL. HEPATOL. 1.979; 2: 236-240.

Ladero J.M.: "Importancia clínica del fenotipo acetilador".
GASTROENTEROL. HEPATOL. 1.981; 4: 256-262.

Ladero J.M.; Arrojo A.; Sánchez de Paz F.; Gilsanz V.: "Efecto de la rifampicina sobre la acetilación hepática polimórfica".
GASTROENTEROL. HEPATOL. 1.981; 4: 15-17.

Ladero J.M.; Arrojo A.; De Salamanca R.E.; Gómez M.; Cano F.; Alfonso M.: "Hepatic acetylator phenotype in diabetes mellitus".
ANN. CLIN. RES. 1.982; 14: 187-189.

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

Ladero J.M.; Arrojo A.: *"Envejecimiento y fenotipo acetilador hepático"*.

REV. IBERAM. INVEST. CLIN. 1.983; 2: 21-26.

Ladero Quesada J.M.; Arrojo Romero A.; Cocero Oviedo E.; Gómez Pérez M.; Cano Iglesias F.; Franco Carcedo C.; Camarero González E.; Sánchez Creus P.: *"Fenotipo acetilador hepático en la polineuropatía diabética"*.

REV. CLIN. ESP. 1.983; 168: 399-402.

Ladero J.M.; Cano F.: *"Fenotipo acetilador en la enfermedad de Basedow"*.

N. ARCH. FAC. MED. 1.983; 41: 79-81.

Ladero Quesada J.M.: *"Acetilación hepática polimórfica"*.

N. ARCH. FAC. MED. 1.984; 42: 263-270.

Ladero J.M.; Kwok C.K.; Jara C.; Fernández L.; Silmi A.M.; Tapia D.; Usón A.C.: *"Hepatic acetylator phenotype in bladder cancer patients"*.

ANN. CLIN. RES. 1.985; 17: 96-99.

Ladero J.M.; Fernández M.J.; Palmeiro R.; Muñoz J.J.; Jara C.; Lázaro C.; Pérez-Manga G.: *"Hepatic acetylator polymorphism in breast cancer patients"*.

ONCOLOGY 1.987; 44: 341-344.

Ladero J.M.; Jiménez L.C.; Fernández M.J.; Robledo A.: *"Acetylator polymorphism in discoid lupus erythematosus"*.

EUR. J. CLIN. ONCOL. 1.988; 34: 307-308.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Lal S.; Singhal S.W.; Burley D.M.; Crossley G.:
"Effect of rifampicin and isoniazid on liver function".
BR. MED. J. 1.972; 1: 148-150.

Lang E.P.; Chu D.Z.J.; Hunter C.F.; Kendall D.C.;
Flammang T.J.; Kadlubar F.P.: *"Role of aromatic amine
acetyltransferase in human colorectal cancer"*.
ARCH. SURG. 1.986; 121: 1.259-1.261.

Larrey D.; Distlerath L.M.; Dannan G.A.; Wilkinson
G.R.; Guengerich F.P.: *"Purification and
characterization of the rat liver microsomal cytochrome
P-450 involved in the 4-hydroxylation of debrisoquine,
a prototype for genetic variation in oxidative drug
metabolism"*.
BIOCHEMISTRY 1.984; 23: 2.787-2.795.

Larrey D.; Pessayre D.; Benhamou J.P.: *"Polymorphisme
génétique du métabolisme hépatique des médicaments"*.
GASTROENTEROL. CLIN. BIOL. 1.985; 9: 522-531.

Larsson R.; Karlsson E.; Molin L.: *"Spontaneous
systemic lupus erythematosus and acetylator phenotype"*.
ACTA MED. SCAND. 1.977; 201: 223-226.

Law MR. Hetzel MR. Idle JR: *"Debrisoquine metabolism
and genetic predisposition to lung cancer."*
BR J CANCER 59:686-687, 1989

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Lawson D.H.; Henry D.A.; Lowe J.; Reavey P.; Rennie J.A.W.; Solomon A.: "Acetylator phenotype in spontaneous SLE and rheumatoid arthritis".

ANN. RHEUM. DIS. 1.979; 38: 171-173.

Leden I.; Hanson A.; Melander A.; Sturfelt G.; Svensson B.; Wahlin-Boll E.: "Varying distribution of acetylation phenotypes in RA patients with and without Sjögren's syndrome".

SCAN. J. RHEUM. 1.981; 10: 253-255.

Leeman T.; Dayer P.; Meyer U.A.: "Single-dose quinidine treatment inhibits metoprolol oxidation in extensive metabolizers".

Lee B.J.D.; Lee L.K.H.: "A simple pharmacokinetic method for separating the three acetylation phenotypes".

BR. J. CLIN. PHARMACOL. 1.982; 13: 375-378.

Lennard M.S.; Silas J.H.; Smith A.J.; Tucker G.T.: "Determination of debrisoquine and its 4-hydroxymetabolite in biological fluids by gas chromatography with flame-ionization and nitrogen-selective detection".

J. CHROMATOGRAPH. 1.977; 133: 161-166.

Lennard M.S., Tucker G.T. Wods H.F.: "The polymorphic oxidation of β -adrenoreceptor antagonists. Clinical Pharmacokinetics considerations".

CLINICAL PHARMACOKINETICS 11:1-17, 1.986

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Levi A.J.; Sherlock S.; Walker D.: *"Phenylbutazone and isoniazid metabolism in patients with liver disease in relation to previous drug therapy"*.
LANCET 1.968; 1: 1.275-1.279.

Levine EG, King RA, Bloomfield C: *"The role of heredity in cancer"*.
J CLIN ONCOL 7:527-540, 1.989

Lou Y.C.; Ying L.; Bertilsson L.; Sjöqvist F.: *"Low frequency of slow debrisoquine hydroxylation in a native chinese population"*.
LANCET 1.987; 2: 852-853.

Lower G.M.; Bryan G.T.: *"Enzymatic N-acetylation of carcinogenic aromatic amines by liver cytosol of species displaying different organ susceptibilities"*.
BIOCHEM. PHARMACOL. 1.973; 22: 1.581-1.588.

Lower G.M.; Nilsson T.; Nelson C.E.; Wolf H.; Gamsky T.E.; Bryan C.T.: *"N-acetyltransferase phenotype and the risk of urinary bladder cancer: approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark"*.
ENVIRON. HEALTH PERSPECT. 1.979; 29: 71-79.

Lower G.M.: *"Chemically induced human urinary bladder cancer"*.
CANCER 1.982; 49: 1.056-1.066.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Lubin J.h.; blot W.J.: *"Assesment of lung cancer risk factor by histologic categories."*

J NATL CANCER INST 1.984, 73:383-388

Lunde P.K.M.; Fislid K.; Hamsteen V.: *"Disease and acetylation polymorphism"*.

CLIN. PHARMACOKINET. 1.977; 2: 132-197.

Mac Geoch C, Morgan ET, Halpert Jet al.: *"Purification, characterization, and pituitary regulation of the sex espezific cytochrome P-450 158-hydroxylase from liver microsome of untreated female rats"*.

J BIL CHEM 259: 15433-15439, 1.984

Maghoub A.; Idle J.R.; Dring L.G.; Lancaster R.; Smith R.L.: *"Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man"*.

LANCET 1.977; 2: 584-586.

Maghoub A.; Idle J.R.; Smith R.L.: *"A population and family study of the defective alicyclic hydroxilation of debrisoquine among egyptians"*.

XENOBIOTICA 1.979; 9: 51-56.

Mansilla-Tinoco R.; Harland S.J.; Ryan P.J.; Bernstein R.M.; Dollery C.T.; Hughes G.R.V.; Bulpitt C.J.; Morgan A.; Jones J.M.: *"Hydralazine, antinuclear antibodies, and the lupus syndrome"*.

BR. MED. J. 1.982; 284: 936-939.

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

Markman M, Braine HG, Bias WB et al.: "Association between HLA Bw 44 and small cell carcinoma of the lung".

NEW ENG J MED 307, 1087, 1.982

Maron D, Ames B.: "Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. "

MUTAT RES 113:173-215, 1.983

Martínez A.: "Carcinogénesis y tabaco. "

PATOLOGIA DEL CONSUMO DE TABACO 11:81-88, 1.988

Mattila M.J.; Tiitinen H.: "The rate of isoniazid inactivation in Finnish diabetic and non-diabetic patients".

ANN. MED. EXP. BIOL. FENN. 1.967; 45: 423-427.

Mbanefo C.; Bababunmi E.A.; Mahgoub A.; Sloan T.P.; Idle J.R.; Smith R.L.: "A study of the debrisoquine hydroxylation polymorphism in a Nigerian population".

XENOBIOTICA 1.980; 11: 811-818.

McCoy E, Rosenkranz HS.: "Cigarette smoking may yield nitroarenes. "

CANCER LETT 15:9, 1.982

McGourty JC, Silas JH, Lennard MS et al.: "Metropol metabolism and debrisoquine oxidation polymorphism-population and family studies. "

BR J CLIN PHARMACOL 20:555-566, 1.985

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

McGourty JC, Silas JH, Fleming JJ et al.:
"Pharmacokinetics and beta-blockin effects of timolol
in poor and extensive metabolizers of debrisoquine. "
CLIN PHARMACOL THER 38:409-413, 1985

McLaren E.H.; Burden A.C.; Moorhead P.J.: "Acetylator
phenotype in diabetic neuropathy".
BR. MED. J. 1.977; 2: 291-293.

McManus M.E.: "Metabolic characterization of human
liver microsomal cytochromes P-450 involved in the
oxidation of debrisoquine, bufuralol and the carcinogen
2-acetylaminofluorene".
PHARMAC. THER. 1.987; 33: 47-53.

McQueen C.A.; Veber V.V.: "Characterization of human
lymphocyte N-acetyltransferase and its relationship to
the isoniazid acetylator polymorphism".
BIOCHEM. GEN. 1.980; 18: 889-903.

Merck H, Rumpf, Bolseu et al.: "Inducibility of
aryl-hydrocarbon hydroxylase activity in human hair
follicles by topical application of liquor carbonis
detergents (coal tar). "
BR J DERMATOL 111:279-284, 1.984

Miller EC, Miller JA JA: "Biochemical mechanisms of
chemical carcinogenesis". in: The molecular biology of
cancer, pp 377-402, Academic Press, Inc, New York).

Miller J.A.; Wyatt C.S.; Miller E.C.; Hartmann H.A.:
"The N-hydroxylation of 4-acetylaminobiphenyl by the

rat and dog and the strong carcinogenicity of N-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl in the rat".

CANCER RES. 1.961; 21: 1.465-1.473.

Miller M.E.; Cosgriff J.M.: "Acetylator phenotype in human bladder cancer".

J. UROL. 1.983; 130: 65-66.

Mitchell J.R.; Thorgeirsson U.P.; Black M.; Timbrell J.A.; Snodgrass W.R.; Potter W.Z.; Jollow D.J.; Kaiser H.R.: "Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators: possible relation to hydrazine metabolites".

CLIN. PHARMACOL. THER. 1.975; 18: 70-79.

Mitchell J.R.; Zimmerman H.J.; Ishak K.G.; Thorgeirsson U.P.; Timbrell J.A.; Snodgrass W.R.; Nelson S.D.: "Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology and probable pathogenesis".

ANN. INTERN. MED. 1.976; 84: 1.91-192.

Molin L.; Larsson R.; Karlsson E.: "Evaluation of the sulphapyridine acetylator phenotyping test in healthy subjects and in patients with cardiac and renal diseases".

ACTA MED. SCAND. 1.977; 201: 217-222.

Kommssen S.; Sell A.; Barfod N.: "N-acetyltransferase phenotypes of bladder cancer patients in a low-risk population".

LANCET 1.982; 2: 1.228.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk
of chemical to humans. Tobacco smoking
ARC 38 (Lyon), 1.986

Morgenstern R, Depierre JW, Lind C et al.: "Benzo (a)
pyrene quinones can be generated by lipid peroxidation
and are conjugated with glutathione S-transferase B from
rat livers. "
BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 99:682-690, 1.981

Morris R.J.; Freed C.R.; Kohler P.F.: "Drug
acetylation phenotype unrelated to development of
spontaneous systemic lupus erythematosus".
ARTHRITIS RHEUM. 1.979; 22: 777-780.

Musch E.; Eichelbaum M.; Wang J.K.; Sassen M.;
Castro-Parra M.; Dengler H.J.: "Die Häufigkeit
hepatotoxischer nebenwirkungen der tuberkulostatischen
kombinations-therapie (INH, RMP, ENB) in abhängigkeit
von acetyliererphänoty".
KLIN. WOCHENSCHR. 1.982; 60: 513-519.

Nakamura K.; Goto F.; Ray W.A.; McAllister C.B.;
Jacqz E.; Wilkinson G.R.; Branch R.A.: "Interethnics
differences in genetic polymorphism of debrisoquine and
mephenytoin hydroxylation between Japanese and
Caucasian populations".
CLIN. PHARMACOL. THER. 1.985; 38: 402-408.

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

Hebert D.W.; González F.J.: "P450 genes and evolutionary genetics".

HOSP. PRACT. (OFF) 1.987; 22: 63-74.

Neil E, Collishaw MA, Kirkbride J et al.: "Tobacco smoke in the workplace: an occupational health hazard."

CAN MED ASSOC J 131, 1.984

Nowak D, Schmidt-Preuss U, Jörres R et al: "Formation of DNA adducts and water-soluble metabolites of benzo(a)pyrene in human monocytes is genetically controlled".

INT J CANCER 41:169-173, 1.988

Oesch F.: "Significance of various enzymes in the control of mutagenic and carcinogenic metabolites derived from aromatic structures. "

TOXICOL PATHOL 12:391-396, 1.984

Olsen H.; Morland J.; "Ethanol-induced in drug acetylation in man and isolated liver cells".

BR. MED. J. 1.978; 2: 1.260-1.262.

Ooi WL, Elston RC, Chen VW et al: "Increased familial risk for lung cancer."

J NCI 76:217-222, 1.986

OMS: Health care in the elderly.: "Report of the technical group on use of medicaments by the elderly. "

DRUGS 22:279-294, 1.981

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Otton S.V.; Inaba T.; Mahon W.A; Kalow V.: *"In vitro metabolism of sparteine by human liver: competitive inhibition by debrisoquine"*.

CAN. J. PHYSIOL. PHARMACOL. 1.982; 60: 102-105.

Otton SV, Inaba T, Kalow V.: *"Inhibition of sparteine oxidation in human liver by tricyclic antidepressants and other drugs."*

LIFE SCIENCES 32:795-800, 1.983

Patterson E.; Radtke H.E.; Weber W.W.: *"Immunochemical studies of rabbit N-acetyltransferases"*.

MOL. PHARMACOL. 1.980; 17: 367-373.

Pegg AE.: *"Alkylation and subsequent repair of DNA after exposure to dimethylnitrosamine and related carcinogens."*

REV BIOCHEM TOXICOL 5:83-133, 1.983

Perry H.M.; Tan E.M.; Carmody S.; Sakamoto A.: *"Relationship of acetyl transferase activity to antinuclear antibodies and toxic symptoms in hypertensive patients treated with hydralazine"*.

J. LAB. CLIN. MED. 1.970; 76: 114-125.

Perry H.M.: *"Late toxicity to hydralazine resembling systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis"*.

AM. J. MED. 1.973; 54: 58-72.

Peto R, Doll R.: *"Keynote address: The control of lung cancer."*

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

LUNG CANCER: CAUSES AND PREVENTION. 1-19 Mizole M,
Coreas P (eds) New York 1.984

Peto. "Review of mortality results in randomised
trials in early breast cancer".
LANCET 1.984, 11 1205

Philip P.A.; Rogers H.J.; Harper P.G.: "Acetylation
and oxidation phenotypes in malignant lymphoma".
CANCER CHEMOTER. PHARMACOL. 1.987; 20: 235-238.

Philip P.A.; Gayed S.L.; Rogers H.J.; Crome P.:
"Influence of age, sex and body weight on the dapsone
acetylation phenotype".
BR. J. CLIN. PHARMACOL. 1.987; 23: 709-713.

Philip P.A.; Rogers H.J.; Millis R.R.; Rubens R.D.;
Cartwright R.A.: "Acetylator status and its
relationship to breast cancer and other diseases of the
breast".
EUR. J. CANCER CLIN. ONCOL. 1.987; 23: 1.701-1.706.

Philip P.A.; Fitzgerald D.L.; Cartwright R.A.; Peake
M.D.; Rogers H.J.: "Polymorphic N-acetylation capacity
in lung cancer".
CARCINOGENESIS 1.988; 9: 491-493.

Pilheu J.A.; De Salvo M.C.; Manchinu I.; De Negroni
H.R.; Szemzo J.: "Incidencia de las alteraciones
hepáticas en relación con el fenotipo acetilador de la
isoniazida".
MEDICINA 1.980; 40: 382-386.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Platzer R.; Kupfer A.; Bircher J.; Preisig R.:
*"Polymorphic acetylation and aminopyrine demethylation
in Gilbert's syndrome"*.

EUR. J. CLIN. INVEST. 1.978; 8: 219-223.

Plummer S, Boobis AR, Davies DS.: *"Is the activation
of aflatoxin B₁ catalysed by the same form of
Cytochrome P-450 as that 4-hydroxylating debrisoquine
in rat and/or man?"*.

ARCH TOXICOL 58:165-170, 1.986

Poirier L.A.; Miller J.A.; Miller E.C.: *"The N and
ring hydroxylation of 2-acetylaminofluorane and the
failure to detect N-acetylation of 2-aminofluorene in
the dog"*.

CANCER RES. 1.963; 23: 790-800.

Price-Evans D.A.; Mahgoub A.; Sloan T.P.; Idle J.R.;
Smith R.L.: *"A family and population study of the
genetic polymorphism of debrisoquine oxidation in a
white British population"*.

J. MED. GENET. 1.980; 17: 102-105.

Price Evans D.A.: *"Survey of the human acetylator
polymorphism in spontaneous disorders"*.

J. MED. GENET. 1.984; 21: 243-253.

Ramsay L.E.; Silas J.H.; Ollerenshaw J.D.; Tucker
G.T.; Phillips F.C.; Freestone S.: *"Should the
acetylator phenotype be determined when prescribing
hydralazine for hypertension?"*.

EUR. J. CLIN. PHARMACOL. 1.984; 26: 39-42.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Reidenberg M.M.; Martin J.H.: *"Acetylator phenotype of patients with systemic lupus erythematosus"*.
DRUG METABOL. DISPOS. 1.974; 2: 71-73.

Reidenberg M.M.; Levy M.; Drayer D.E.; Zylber-Katz E.; Robbins W.C.: *"Acetylator phenotype in idiopathic systemic lupus erythematosus"*.
ARTHRITIS RHEUM. 1.980; 23: 569-573.

Riska H.: *"Hepatitis cases in isoniazid treated groups and in a control group"*.
BULL. INT. UNION TUBERC. 1.976; 51: 203-206.

Ritchie J.C.; Crothers M.J.; Idle J.R.; Greig J.B.; Connors T.A.; Nikolov I.G.; Chernozemsky I.N.: *"Evidence for an inherited metabolic susceptibility to endemic (Balkan) nephropathy"*. In: Strahinjac S.; Stefanovic V (eds.).
Proceedings of the fifth symposium on endemic (Balkan) nephropathy.

Ritter J.; Somasundaram R.; Heinemeyer G.; Roots I.: *"The debrisoquin hydroxylation phenotype and the acetylator phenotype as genetics risk factors for the occurrence of larynx and pharynx carcinoma"*.
ACTA PHARMACOL. TOXICOL. (COPENH.) 1.986; Suppl. V: 221.

Robinson RC, Cheng KCH, Park SS et al.: *"Structural comparison of monoclonal antibody immunopurified*

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

pulmonary and hepatic cytochrome P-450 from 3-methylcholantrene-treated rats. "

BIOCHEM PHARMACOL 35:3827-3830, 1.986

Roomi MV, HO RK, Sarma DSR et al.: *"A common biochemical pattern in preneoplastic hepatocyte nodules generated in four different models in the rat. "*

CANCER RES 45:564-571, 1.985

Roots F.; Otte G.; Berchtold G.; Heinemeyer G.; Schmidt D.; Cornaggia C.: *"Debrisoquine phenotyping in epileptic patients treated with phenytoin and carbamazepine".*

BIOCHEM. PHARMACOL. 1.985; 34: 447-448.

Roots I.; Schütze S.; Korge M.; Drakoulis N.; Heinemeyer G.; Kampf D.; Loch H.; Karabias T.: *"Genetic host factors possibly predisposing to gastric cancer: hydroxylator and acetylator status and ABO blood groups".*

ACTA PHARMACOL. TOXICOL. (COPENH.) 1.986; Suppl. V: 220.

Roots I.; Heinemeyer G.; Drakoulis N.; Kampf D.: *"The role of Pharmacogenetics in drug epidemiology".* In Kewitz H.; Roots I.; Voigt K.: *Epidemiological concepts in clinical pharmacology.* SPRINGER-VERLAG BERLIN, HEIDELBERG 1.987. Pp. 105-118.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Roots I, Drakoulis N, Ploch M et al: *"Debrisoquine hydroxilation phenotype, acetylation phenotype and ABO groups as genetic host factors in lung cancer"*.
KLIN WOCHENSCHR 1.988; 27:646-7

Rosso R, Donnelly MG, Franchi G et al: *"Impairment of drug metabolism in tumour-bearing animals"*.
EUR J CANCER 7:565, 1.971

Ruckpaul K, Rein H, Blanck J.: *"Regulation mechanismen des endoplasmatischen Zytochrom P-450-Systems der Leber"*.
BIONED BIOCHIM ACTA 44:351-379, 1.985

Rüdiger V, Nowak D, Hartmann K, et al.: *"Enhanced formation of benzo(a)pyrene : DNA adducts in monocytes of patients with presumed predisposition to lung cancer"*.
CANCER RES 45:5890-5894, 1.985

Samet JM, Humble CG, Pathak DR: *"Personal and family history of respiratory disease and lung cancer risk"*.
AM REV RESPIR DIS 134:466-470, 1.986

Sarma G.R.; Kailasam S.; Nair M.G.K.; Narayana A.S.L.; Tripathy S.P.: *"Effect of prednisolone and rifampicin on isoniazid metabolism in slow and rapid inactivators of isoniazid"*.
ANTIMICROB. AG. CHEMOTER. 1.980; 18: 661-666.

Schneck D.W.; Sproun J.S.; Shiroff R.A.; Vary J.E.; Dewitt F.O.; Hayes A.H.: *"Effect of coadministration of*

POLIMORFISMOS ENZIMÁTICOS EN CÁNCER DE PULMÓN

procainamide and isoniazid on each other's acetylation pathway".

Schoenberg JB, Wilcox HB, Mason TJ et al: *"Variation in smoking-related lung cancer risk among New Jersey women."*

AM J EPIDEMIOL 1989; 130:688-695

Schröder P.; Klitgaard M.A.; Simonsen E.: *"Significance of the acetylation phenotype and the therapeutic effect of procainamide".*

EUR. J. CLIN. PHARMACOL. 1979; 15: 63-68.

Seidegard J, Pero RV, Miller DG et al.: *"A glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer".*

CARCINOGENESIS 7:751-753, 1986

Shenfield G.M.; McCann V.J.; Tjokresetio R.: *"Acetylator status and diabetic neuropathy".*

DIABETOLOGIA 1982; 22: 441-444.

Shanabruch WG, Walker GC.: *"Localization of the plasmid (pKM 101) gene(s) involved in rec A⁺ lex A⁻ dependent mutagenesis. "*

MOL GEN GENET 179:289-297, 1980

Shimada T, Iwasaki M, Martin MV et al: *"Human liver microsomal cytochrome P-450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by urine gene response Salmonella Typhimurium TA 1535/pSK 1002."*

CANCER RES 1989; 49:3218-28

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

Simmon VF.: *"Applications of the Salmonella/microsome assay."* In short-terms for chemical carcinogens pp 120-126. Stich HF, San RHC (eds) Springer Verlag (New York) 1.981

Singapore Tuberculosis Service/British Medical Research Council: *"Controlled trial of intermittent regimens of rifampin plus isoniazid for pulmonary tuberculosis in Singapore: The results up to 30 months"*.

AM. REV. RESPIR. DIS. 1.977; 116: 807-820.

Singer B, Grunberger D.: *"Molecular biology of mutagens and carcinogens."*

PLENUM PUBLISHING CORPORAT 45-96 (New York) 1.983

Singer B, Grunberger D.: *"Molecular biology of mutagens and carcinogens."*

PLENUM PUBLISHING CORPORAT 221-253 (New York) 1.983

Sjöquist F, Borgå O, Læ ORME M.: *"Principios de farmacología clínica."* In: *Farmacología clínica y terapéutica.*

Principios y práctica. ed SALVAT . Barcelona 1.983:1-58

Sloan T.P.; Lancaster R.; Shah R.; Idle J.R.; Smith R.L.: *"Genetically determined oxidation capacity and the disposition of debrisoquine"*.

BR. J. CLIN. PHARMACOL. 1.983; 15: 443-450.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Sloan TP, Idle JR Smith RL.: "Influence of DH/DL alleles regulating debrisoquine oxidation on phenitoin hydroxylation. "

CLIN PHARMACOL THER

Smith J.; Tyrrell V.F.; Gow A.; Allen G.W.; Lees A.V.: "Hepatotoxicity in rifampin-isoniazid treated patients related to their rate of isoniazid inactivation".

CHEST 1.972; 61: 587-588.

Speirs C.J.; Murray DS, Davies: "Debrisoquine oxidation phenotype and susceptibility to lung cancer."

BR J CLIN PHARMACOL 1.990, 29:101-109

Spina E, Göransson M et al.: "Effect of antiepileptic drugs on the 2-hydroxylation of desmethyldimipramine in human liver microsomes. "

IRCS MED SCI 12:1123-1124, 1.984

Steiner E, Iselius L, Alvan G et al.: " A family study of genetic and enviromental factors determining polymorphic hydroxilation of debrisoquine".

CLIN PHARMACOL THER 38:394-401, 1.985

Steiner E, Alvan G, Garla M et al.: "The debrisoquine hydroxylation phenotype does not predice the metabolism of phenitoin. "

CLIN PHARMACOL THER 42:326-333, 1.987

POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EN CÁNCER DE PULMÓN

Steiner E.; Spina E.: *"Differences in the inhibitory effect of cimetidine on desipramine metabolism between rapid and slow hydroxylators"*.

CLIN. PHARMACOL. THER. 1987; 42: 278-282.

Stollar B.D.: *"Nucleic acid antigen"*. In *"The antigens"* M. Sela Ed. Academic Press. NEW YORK 1973. Vol. 1. Pp.: 1-85.

Stollar B.D.: *"The antigenic potential and specificity of nucleic acids, nucleoproteins and their derivatives."*

ARTHRITIS RHEUM 24:1010-1016, 1981

Sugiura M, Yamazaki Y, Kamataki T.: *"Reduction of epoxide derivatives of benzo (a) pyrene by microsomal cytochrome P-450."*

CANCER RES 40:2910-2914, 1980

Sugimura T.: *"A view of a cancer researcher on environmental mutagens."*

Proceedings on the third International Conference of Environmental Mutagens, In: Takebe (ed) pp 3-20, University of Tokyo 1982

Sugimura T.: *"Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process."*

MUTATION RESEARCH 150:33-41, 1985

Syvälahti E.K.G.; Lindberg R.; Kallio J.; De Vocht M.: *"Inhibitory effects of neuroleptics on debrisoquine oxidation in man"*.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

BR. J. CLIN. PHARMACOL. 1986; 22: 89-92.

Takayama S, Masuda M, Morgami M et al: "Induction of cancers in the intestine, liver and various other organs of rats by feeding mutagens from glutamic acid pyrolysate".
GANN 1984;75:207-213).

Tokuhashi GK, Lillienfeld AM: "Familial aggregation of lung cancer in humans".
JNCI 30:289-312, 1963

Tucker GT, Silas JH, Iyem AO et al.: "Polymorphic hydroxylation of debrisoquine".
LANCET 2:718, 1977

US Department of health and human services.: "The health consequences of smoking: Cancer. A report of the Surgeon General. "
DHHS (PHS), Rockville, 1982

US Interagency group staff on carcinogens.: "Chemical carcinogens: A review of the science and its associated principles. "
ENVIRON HEALTH PERSP 67:201-282, 1986

Vandenberg M.J.; Wright P.; Holmes J.; Rogers H.J.; Ahmad R.A.: "The hypotensive response to hydralazine, in triple therapy, is not related to acetylator phenotype".
BR. J. CLIN. PHARMACOL. 1982; 13: 747-750.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Vansant J.; Woosley R.L.; John J.T.; Sargent J.S.:
"Normal distribution of acetylation phenotypes in systemic lupus erythematosus".

ARTHRITIS RHEUM. 1.978; 21: 1.92-195.

Varley H.: *"Practical clinical biochemistry"*. 3^a ed.
Heinemann Co. London 1.962.

Vertal R.E.; Kornhauser D.M.; Hollifield J.N.; Shand D.G.: *"Inhibition of propranolol metabolism by chlorpromazine"*.

CLIN. PHARMACOL. THER. 1.979; 25: 1.9-24.

Viznerova A, Slavikova, Ellard GA: *"The determination of the acetylator phenotype in tuberculosis patients in Tchechoslovakia using sulfamidine"*

TUBERCLE 1973, 54:67-71.

Vogel F & Motusky A.G. (eds). Springer, New York, 1.979

HUMAN GENETICS

Weber W.W.: *"Acetylating, deacetylating and amino acid conjugating enzymes"*. In Handbook of Pharmacology. Ed. Prodic and Gillete. SPRINGER VERLAG. BERLIN. 1.974. Vol. 28, part 2. Pp.: 564-583.

Weber W.W.; Hein D.W.; Litwin A.; Lower G.M.: *"Relationship of acetylator status to isoniazid toxicity, lupus erythematosus and bladder cancer"*.

FED. PROC. 1.983; 42: 3.086-3.097.

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

Weber W.V.; Hein D.W.: "*N*-acetylation pharmacogenetics".

PHARMACOL. REV. 1.985; 37: 25-79.

Woodhouse K.V.; Adams P.C.; Clothier A.; Mucklow J.C.; Rawlins M.D.: "*N*-acetylation phenotype in bladder cancer".

HUM. TOXICOL. 1.982; 1: 443-445.

Woodhouse N.M.; Andoh B.; Mahgoub A.; Sloan T.P.; Idle J.R.; Smith R.L.: "*Debrisoquin* hydroxylation polymorphism among Ghanaians and Caucasians".

CLIN. PHARMACOL. THER. 1.979; 26: 584-591.

Woosley R.L.; Nies A.S.; Drayer D.; Reidenberg M.; Oates J.A.: "*Acetylator* phenotype as a factor in procainamide-induced lupus erythematosus".

CLIN. RES. 1.977; 25: 279 A.

Woosley R.L.; Drayer D.E.; Reidenberg M.M.; Nies A.S.; Carr K.; Oates J.A.: "*Effect of acetylator* phenotype on the rate at which procainamide induces antinuclear antibodies and the lupus syndrome".

N. ENG. J. MED. 1.978; 298: 1.157-1.159.

Young J.R.: "*Acetylator* status and liver function profile changes in labyrinthine ischaemia patients treated with thymoxamine".

J. INT. MED. RES. 1.980; 8: 356-357.

Zidek Z.; Janku I.: "*Estrogen-dependent* differences in the acetylation of *su2*Tadimidine in the rat".

POLIMORFISMOS ENZIMATICOS EN CANCER DE PULMON

PHARMACOLOGY 1.979; 1.9: 209-214.